

PRACA
DYPLOMOWA

Synteza nowych inhibitorów układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny

**The synthesis of the novel thioredoxin –
thioredoxin reductase system inhibitors**

mgr inż. Szymon Kłossowski

Praca doktorska

wykonana w Instytucie Chemii Organicznej PAN

w latach 2009 – 2014

Promotor: Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski

A-21-6

K-C-127

K-C-130

K-d-134

Warszawa 2015

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.366/15



B. Org. 366/15



*Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi,
Panu Prof. dr hab. inż. Ryszardowi Ostaszewskiemu
za wybór interesującej tematyki badawczej oraz za wszechstronną pomoc podczas
realizacji niniejszej pracy.*

*Dziękuję również koleżankom i kolegom z Zespołu XX, w szczególności Annie Brodzkiej
oraz Małgorzacie Zysk za wiele lat wspólnej pracy i za rady dotyczące reakcji
enzymatycznych.*

Dziękuję mojej Żonie, Aleksandrze za motywację i wsparcie.

Bardzo serdecznie dziękuję całemu zespołowi Prof. Jakuba Gołąba z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w szczególności Angelice Muchowicz, za ogrom pracy włożony w wykonanie badań biologicznych.

W szczególności dziękuję Dr Wiktorowi Szymańskiemu, za nieocenione porady i wiedzę, niezbędne do wykonania niniejszych badań.

Dziękuję, Sarze Szymkuć, Barbarze Wiraszce, Panu Dr Stanisławowi Berłozickiemu oraz Panu Wiktorowi Ignacakowi za pomoc w syntezie związków.

Bardzo serdeczne podziękowania kieruję również do Dr Dominika Koszelewskiego za wszechstronną pomoc w pracy nad publikacjami.

Chciałbym również serdecznie podziękować Dyrektorowi Instytutu Chemii Organicznej Państwowej Akademii Nauk za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej.

Wykonane badania były realizowane w ramach projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” Nr projektu: POIG.01.03.01-00-158/09-07



Część badań wykonanych w niniejszej pracy została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu PRELUDIUM, nr umowy: UMO-011/03/N/ST5/0435.



Mojemu Synowi,

Tomaszowi

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej ukazały się w następujących publikacjach:

1. Kłossowski, S., Wiraszka, B., Berłożecki, S., Ostaszewski, R., „*Model studies on the first example of the enzyme-catalyzed Ugi reaction*” *Org. Lett.* **2013**, 5, 566-569.
2. Kłossowski, S., Muchowicz, A., Świech, M., Firczuk, M., Redzej, A., Gołąb, J., Ostaszewski, R., „*Studies towards peptido-mimetic inhibitors of thioredoxin system*” *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 55-67.
3. Kłossowski, S., Brodzka, A., Zysk, M., Ostaszewski, R., “*Chemoenzymatic synthesis and application of new, mild-cleavable chiral auxiliary for synthesis of peptidomimetics via Ugi reaction*” *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, 25, 435-442

Związki otrzymane podczas wykonywania badań zostały zastrzeżone w następujących patentach:

1. Ostaszewski, R., Kłossowski, S., Ziuzia, I., Szokalska, A., Świech, M., Gołąb, J., “*Preparation of novel esters (acyloxymethyl)acrylamide as inhibitors of the thioredoxin/thioredoxin reductase system*” PCT Int. Appl. 2012, WO 2012050465 A1 2012041
2. Ostaszewski, R., Kłossowski, S., Izabela Zuzia, Gołąb, J., Szokalska, A., Świech, M., 2010 „*Nowe estry (acyloksymetylo)akrylamidu, zawierająca je kompozycja farmaceutyczna oraz ich zastosowanie*” Polskie zgłoszenie patentowe nr: P.392651

Opublikowane prace, które nie wchodzi w skład rozprawy doktorskiej:

1. Muchowicz A., Firczuk, M., Wachowska, M., Kujawa, M., Jankowska-Steifer, E., Gabrysiak, M., Pilch, Z., Kłossowski, S., Ostaszewski, R., Golab, J., „*SK053 triggers tumor cells apoptosis by oxidative stress-mediated endoplasmic reticulum stress*” *Biochem. Pharm.* „*In press*”
2. Muchowicz, A., Firczuk, M., Chlebowska, J., Nowis, D., Stachura, J., Barankiewicz, J., Trzeciecka, A., Kłossowski, S., Ostaszewski, R., Zazdzon, R., Pu, J-X, Sun, H-D, Golab, J. „*Adenanthin targets proteins involved in the regulation of disulphide bonds*” *Biochem. Pharm.* **2014**, 89, 210-216
3. Szymanski W., Zwolinska, M., Kłossowski, S., Młynarczuk-Biały, I., Biały, Ł., Issat, T., Malejczyk, J., Ostaszewski, R., “*Synthesis of Novel, Peptidic Kinase Inhibitors with Cytostatic/Cytotoxic Activity*” *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 1773-1781

4. Kłossowski, S., Redzej, A., Szymkuć, S., Ostaszewski, R., “*Studies towards enzymatic kinetic resolutions of 1,3-diol peptidomimetics obtained via the Ugi reaction*” *ARKIVOC*, **2013**, 4, 134-143.

Zgłoszenia patentowe zawierające wyniki nieujęte w pracy doktorskiej:

1. Ostaszewski, R., Ćwiklak, M., Wóltańska, A., Kłossowski, S., 2011, „*Sposób biokatalitycznego wytwarzania chiralnych, nieracemicznych kwasów i estrów kwasów karboksylowych z zastosowaniem ortoestrów kwasów aromatycznych i związków do stosowania w tym sposobie*” Polskie zgłoszenie patentowe nr: P 394723

2. Ostaszewski, R., Ćwiklak, M., Wóltańska, A., Kłossowski, S., Żądło, A., 2011, „*Sposób wytwarzania achiralnych i chiralnych, nieracemicznych estrów kwasów karboksylowych*” Polskie zgłoszenie patentowe nr: P.394228

3. Ostaszewski, R., Ćwiklak, M., Wóltańska, A., Kłossowski, S., Żądło, A., 2011, „*Sposób wytwarzania estrów kwasów karboksylowych z wykorzystaniem mieszaniny enzymów oraz węglanów alkilowych oraz kompozycja znajdująca w nim zastosowanie*” Polskie zgłoszenie patentowe nr: P 394722

Wykaz skrótów stosowanych w niniejszej pracy:

Ac – grupa acylowa – $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$	Me – grupa metylowa $-\text{CH}_3$
AcOH – kwas octowy	MeCN – acetonitryl
AcCl – chlorek kwasu octowego	Ms – grupa metanosulfonylowa CH_3SO_3-
Ar – grupa aromatyczna	NAD – dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy
Bn – grupa benzylowa – $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$	Novozym 435 – immobilizowana lipaza B z <i>Candida antarctica</i>
Bu – grupa butylowa – C_4H_9-	OMe – grupa metoksy $\text{CH}_3\text{O}-$
i-Bu – grupa <i>izo</i> -butylowa	PG – grupa zabezpieczająca
CAL-B – lipaza B z <i>Candida antarctica</i>	PLP – fosforan 5'-pirydoksalu
Cys – Cysteina	Ph – grupa fenylowa C_6H_5-
DBU - 1,8-diazabicyklo(5.4.0)undek-7-en	RP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa na fazach odwróconych
DCC – <i>N,N</i> -dicykloheksylokarbodiimid	SAR – badania zależności aktywności od struktury
DCM - dichlorometan	Ser – seryna
de – nadmiar diastereoizomeryczny	TEA - trietyloamina
DIPEA – <i>N,N</i> -diizopropyl- <i>N</i> -etyloamina	THF – tetrahydrofuran
DMAP – 4-(<i>N,N</i> -dimetyloamino)-pirydyna	t. pok. – temperatura pokojowa
DMB – grupa 2,4-dimetoksybenzylowa	TLC – chromatografia cienkowarstwowa
DMBA – 2,4 - dimetoksybenzyloamina	Trx – tioredoksyna
d.r. – proporcja diastereoizomerów	TrxR – reduktaza tioredoksyny
E – enancjoselektywność	Ts – grupa 4-toluenosulfonylowa
EDC - <i>N</i> -(3-dimetyloaminopropyl)- <i>N'</i> -etylokarbodiimid	4-(CH_3) $\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3-$
e.e. - nadmiar enancjomeryczny	U-MCR – reakcja multikomponentowa Ugiego
EKR – enzymatyczny kinetyczny rozdział	Wyd. – wydajność reakcji
Et – grupa etylowa C_2H_5-	
FAD - Dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy	
His – histydyna	
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa	
MCR – reakcja multikomponentowa	

Spis treści

1.	Wstęp	1
2.	Reakcje multikomponentowe w syntezie peptydomimetyków	3
2.1.	Reakcja Ugięgo	4
2.1.1.	Diastereoselektywne warianty reakcji Ugięgo	6
2.1.1.1.	Reakcja Ugięgo z chiralnymi aminami	6
2.1.1.2.	Wybrane przykłady reakcji Ugięgo z innymi niż amina chiralnymi substratami	8
2.1.1.3.	Wybrane przykłady reakcji Ugięgo z nieracemicznymi aminokwasami i iminami.....	10
2.1.2.	Reakcja Ugięgo z ekwiwalentem amoniaku.....	12
2.1.3.	Reakcja Ugięgo z izocyjankiem modyfikowalnym.....	14
2.1.4.	Katalityczne warianty reakcji Ugięgo	16
2.1.5.	Podsumowanie rozdziału	17
3.	Enzymy, jako naturalne katalizatory „nienaturalnych” reakcji	18
3.1.	Enzymy jako katalizatory do rozdziału kinetycznego enancjomerów	18
3.2.	Zastosowanie enzymatycznego rozdziału kinetycznego w syntezie chiralnych amin pierwszorzędowych.....	19
3.2.1.	Rozdział kinetyczny racemicznych amin z wykorzystaniem hydrolaz	20
3.2.2.	Rozdział kinetyczny racemicznych amin z wykorzystaniem transaminaz.....	22
3.3.	Metody chemoenzymatyczne wykorzystujące reakcję Ugięgo	24
3.4.	Promiskuityzm enzymatyczny	25
3.4.1.	Promiskuityzm lipaz	27
3.5.	Podsumowanie rozdziału	28
4.	Układ tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny jako cel terapeutyczny w leczeniu nowotworów	30
4.1.	Reduktaza tioredoksyny	32
4.2.	Tioredoksyna.....	32
4.3.	Układ tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny w leczeniu nowotworów	34
4.3.1.	Inhibitory układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny	35
4.3.1.1.	Związki zawierające atom metalu	35
4.3.1.2.	Związki alkilujące	37
4.4.	Podsumowanie rozdziału	39
5.	Badania własne	41
5.1.	Koncepcja i cel badań	41
5.2.	Badania nad syntezą peptydomimetyków z fragmentami elektrofilowymi.....	43
5.2.1.	Badania nad opracowaniem syntezy peptydomimetyków, zawierających grupę dibromometylową oraz ich analogów.....	43

5.2.1.1.	Synteza substratów do reakcji Ugiego	44
5.2.1.2.	Badania nad otrzymaniem peptydomimetyków w reakcji Ugiego.....	45
5.2.2.	Wyniki badań aktywności biologicznej uzyskanych związków względem układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny.....	47
5.2.3.	Badania nad opracowaniem metody syntezy związków z grupą 2-(bromometylo)akrylową	50
5.2.3.1.	Wyniki badań biologicznych nad aktywnością peptydomimetyków zawierających aktywowane wiązanie podwójne.	52
5.2.4.	Badania nad metodą syntezy β -acyloksymetakryloamidów	54
5.2.4.1.	Badania modelowe nad aktywnością biologiczną związków z grupą β -acyloksymetakrylową.....	54
5.2.4.2.	Badania nad syntezą peptydomimetyków z fragmentem β -acyloksymetakrylowym.	56
5.2.4.3.	Wyniki badań biologicznych nad aktywnością β -acyloksyakryloamidów.....	56
5.3.	Badania nad opracowaniem chemoenzymatycznej metody syntezy nowego pomocnika chiralnego do reakcji Ugiego.....	59
5.3.1.	Synteza racemicznej 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy	61
5.3.2.	Badania nad opracowaniem metody syntezy chiralnej nieracemicznej 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy	62
5.3.2.1.	Enzymatyczny kinetyczny rozdział enancjomerów 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy	62
5.3.3.	Badania nad diastereoselektywną reakcją Ugiego z wykorzystaniem nowego pomocnika chiralnego	65
5.3.4.	Badania nad syntezą chiralnych nieracemicznych β -acyloksymetakryloamidów z wykorzystaniem (S)-1-(2,4-dimetoksy-fenylo)etyloaminy	67
5.4.	Synteza biblioteki β -acyloksymetakryloamidów do badań zależności aktywności od struktury.....	69
5.4.1.	Synteza peptydomimetyków z różnymi fragmentami P ₁	69
5.4.2.	Synteza peptydomimetyków z różnymi fragmentami P ₂	72
5.4.3.	Badania nad syntezą cyklicznych peptydomimetyków - zmiana fragmentu P ₀	73
5.4.4.	Wyniki badań biologicznych dla otrzymanej biblioteki związków	75
5.5.	Badania nad opracowaniem reakcji Ugiego katalizowanej enzymami	80
5.5.1.	Badania modelowe nad opracowaniem reakcji Ugiego katalizowanej enzymami ..	80
5.5.2.	Synteza α -aminoamidów z wykorzystaniem reakcji Ugiego katalizowanej enzymami	83
6.	Wnioski	86
7.	Część eksperymentalna	88
7.1.	Uwagi ogólne	88
7.2.	Badania nad syntezą peptydomimetyków z fragmentami elektrofilowymi	89

7.3.	Badania nad opracowaniem enzymatycznej syntezy nowego pomocnika chiralnego do reakcji Ugiego	99
7.4.	Badania nad syntezą biblioteki β -acyloksymetakryloamidów.....	104
7.4.1.	Synteza substratów do reakcji Ugiego.....	104
7.4.2.	Synteza peptydomimetyków.....	107
7.4.2.1.	Synteza peptydomimetyków z wykorzystaniem kwasu 307.....	107
7.4.2.2.	Synteza peptydomimetyków z wykorzystaniem kwasu 2-(bromometylo)akrylowego.	109
7.5.	Modelowe badania nad reakcją Ugiego katalizowaną enzymatycznie	123
8.	Cytowana literatura.....	127

1. Wstęp

Choroby nowotworowe są jednymi z najbardziej groźnych schorzeń współczesnego świata. Co roku zostaje zdiagnozowanych 14 mln przypadków raka, z których ponad połowa (8.2 mln) kończy się zgonem. Światowa organizacja zdrowia (WHO) szacuje, że w ciągu najbliższych dwóch dekad świat będzie zmagał się z tzw. „falą pływową” liczby chorych na raka i już w 2025 r. liczba diagnozowanych przypadków wzrośnie do 19 mln, a w 2035 r., do 24 milionów.¹ Najbardziej powszechnymi metodami leczenia nowotworów są: zabiegi operacyjne, chemioterapia i radioterapia. Chemioterapia to metoda leczenia polegająca na zabiciu lub powstrzymaniu rozwoju komórek nowotworowych przez zastosowanie odpowiednich leków. Niestety, obecnie stosowane chemoterapeutyki charakteryzują się dużą toksycnością i wieloma efektami ubocznymi. Ponadto, szybko dzielące się komórki rakowe są w stanie uodpornić się na terapię, co drastycznie obniża ich skuteczność. Są to powody, dla których nie istnieje efektywna i jednocześnie bezpieczna metoda leczenia chorób nowotworowych.

Podstawą skutecznej chemioterapii jest znalezienie odpowiedniego związku o zdefiniowanej strukturze, który ma wywołać selektywny efekt cytotoksyczny lub cytostatyczny tylko w komórkach nowotworowych. W projektowaniu takich związków chemicznych pomocne jest ustalenie tzw. celu terapeutycznego, czyli miejsca, w którym działanie leku wywołuje oczekiwany efekt biologiczny. W wielu przypadkach jest to receptor lub enzym, których to aktywacja lub inhibicja powoduje określone działanie na komórki rakowe. Znajomość struktury enzymu, będącego celem terapeutycznym daje możliwość zaprojektowania związku chemicznego, który może selektywnie modyfikować ten enzym i wywołać odpowiedni efekt biologiczny.

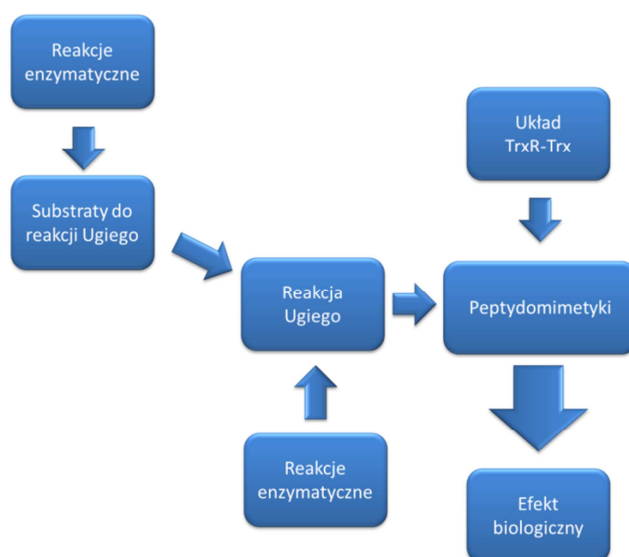
W ostatnich dekadach znacząco zwiększył się potencjał badań przesiewowych (*ang. High Throughput Screening, HTS*), które pozwalają na szybką identyfikację nowych związków biologicznie aktywnych lub nowych kierunków aktywności biologicznych znanych związków. Dodatkowo, rośnie znaczenie metod teoretycznych, które umożliwiają projektowanie *in silico* związków o budowie dopasowanej do struktury przestrzennej enzymu.

¹ International Agency for Research on Cancer, GlobCan Program, World Health Organization; www.globcan.iarc.fr

Pomimo dynamicznego rozwoju tych metod, wciąż decydującym etapem jest synteza związków o ściśle określonej budowie chemicznej. Jest to niezbędne do weryfikacji ich aktywności biologicznej w testach *in vitro* i/lub *in vivo*. Ponadto, po zidentyfikowaniu aktywnego związku, konieczne jest określenie zależności pomiędzy aktywnością biologiczną a jego strukturą przestrzenną. Nie zawsze jednak, znane metody syntezy, prowadzą do związków enancjomerycznie czystych. Uzasadnia to konieczność badań nad opracowaniem nowych, uniwersalnych oraz prostych metod syntezy opisywanych substancji, również w formie enancjomerycznie czystej.

Niniejsze badania miały na celu otrzymanie nowych związków, które miały być inhibitorami układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny. Układ ten jest jednym z nowych celów terapeutycznych w leczeniu chorób nowotworowych. Uważa się, że jego hamowanie destabilizuje procesy w komórkach rakowych, co powinno prowadzić do ich śmierci lub uwrażliwienia na już stosowane terapie.

W przedłożonej pracy przeprowadzono badania nad opracowaniem metody syntezy nowej grupy inhibitorów, o strukturze peptydomimetyków, które mogą posiadać aktywność przeciwnowotworową. Narzędziami wybranymi do realizacji obranego celu syntetycznego były multikomponentowa reakcja Ugiego, umożliwiająca wygodną syntezę peptydomimetyków oraz wybrane reakcje enzymatyczne. Reakcje enzymatyczne mogą posłużyć do stereoselektywnej syntezy substratów do reakcji Ugiego, co może prowadzić do uzyskania nieracemicznych peptydomimetyków. Aktywności biologiczne otrzymanych w pracy peptydomimetyków zostaną zbadane w modelach enzymatycznych, na izolowanym układzie tioredoksyna – reduktaza tioredoksyna oraz w modelach komórkowych.



2. Reakcje multikomponentowe w syntezie peptydomimetyków

Peptydomimetyki stanowią grupę związków, posiadających cechy strukturalne takie jak w naturalnych peptydach, dzięki czemu mogą wiązać się z tymi samymi enzymami lub receptorami, co naturalne peptydy, powodując ich aktywację lub inhibicję.²

Duże znaczenie peptydomimetyków w chemii medycznej wynika z faktu, iż w naturze olbrzymia liczba związków biologicznie aktywnych to peptydy. Wyróżnić można wśród nich zarówno endogenne hormony (np. oksytocyna) jak również egzogenne toksyny, występujące np. w jadzie pająków.³ Pomimo to, peptydy nie są szeroko stosowane jako leki. Spowodowane jest to ich szybkim metabolizmem w organizmie (rozkład przez proteazy obecne w komórkach i przewodzie pokarmowym) oraz ograniczonym wchłanianiem i przenikaniem przez błony biologiczne. Peptydomimetyki projektowane są tak, aby wykazywały większą odporność na proteazy (np. poprzez zastosowanie nienaturalnych aminokwasów) oraz lepszą przenikalność przez błony w porównaniu do naturalnych peptydów (np. przez zmianę polarności). Dzięki temu, związki te mogą posiadać aktywność biologiczną taką jak peptydy, jednocześnie wykazując lepsze parametry farmakokinetyczne. Obecnie peptydomimetyki stosowane są m. in. jako: inhibitory proteazy HIV⁴, inhibitory preteasomów⁵ oraz inhibitory γ -sekreazy.⁶

Ponieważ peptydomimetyki zawierają fragmenty niewystępujące w naturalnych peptydach, ich synteza jest dużo bardziej złożona niż synteza naturalnych peptydów. Jednymi z bardziej efektywnych metod otrzymywania peptydomimetyków są te, w których wykorzystuje się reakcje multikomponentowe. Są to przemiany w których reagują co najmniej trzy substraty, przy czym większość ich atomów jest wprowadzanych do cząsteczki produktu.⁷ W ich wyniku otrzymuje się w prosty sposób rozbudowaną bibliotekę związków.⁸ Spośród reakcji multikomponentowych stosowanych do syntezy peptydów i peptydomimetyków szczególne znaczenie mają te, w których jednym z komponentów jest izocyjanek. Są to: trójkomponentowa reakcja Passeriniego oraz czterekomponentowa reakcja Ugiiego (4-UMCR).

² Gante, J., *Angew. Chem., Int. Ed.* **1994**, 33, 1699

³ Tsetlin, V., *Eur. J. Biochem.*, **1999**, 264, 281

⁴ Park, C.; Choi, H.; Son, Y.-C.; Lee, C.S.; Choy, N.; Koh, J.S.; Lee, T.G.; Kwon, Y.D.; Kim, S.C.; Yoon, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 585

⁵ Swieten van, P.F.; Samuel, E.; Hernández, R.O.; van den Nieuwendijk, A.M.C.H.; Leeuwenburgh, M. A.; Marel van der, G.A.; Kessler, B.M.; Overkleeft, H.S.; Kisselev, A.F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 3402

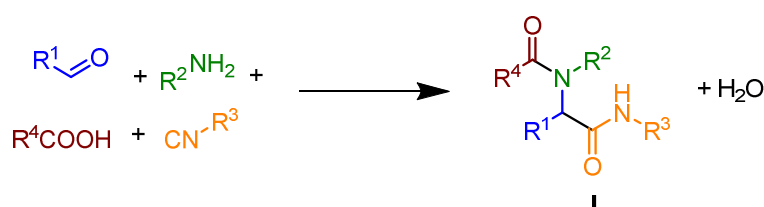
⁶ Prasad, C.V.C.; Vig, S.; Smith, D.W.; Gao, Q.; Polson, C.T.; Corsa, J.A.; Guss, V.L.; Loo, A.; Barten, D.M. Zheng, M.; Felsenstein, K.M.; Roberts, S.B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 3535

⁷ Domling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 3168

⁸ Dömling, A., *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 17

2.1. Reakcja Ugiego

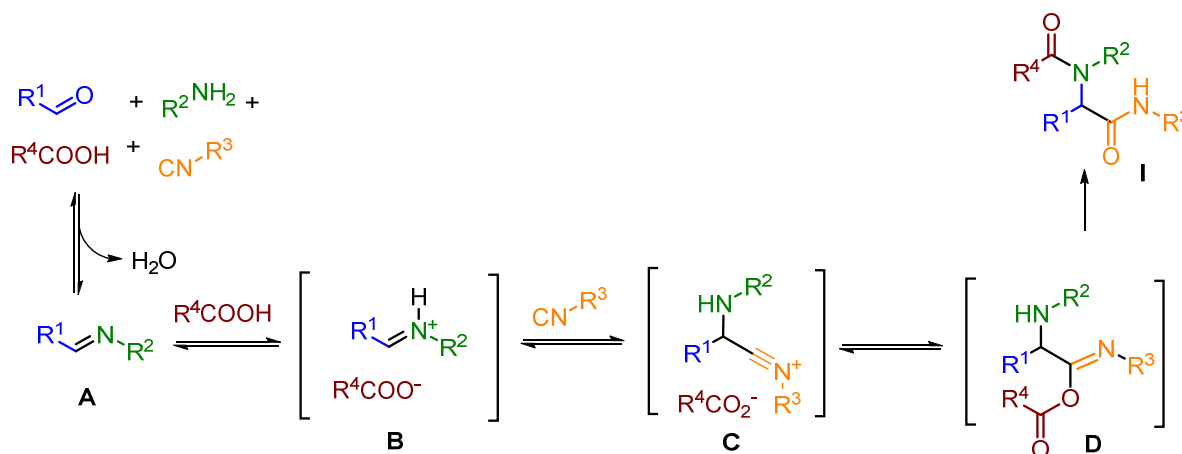
Reakcja Ugiego jest jedną z najważniejszych reakcji multikomponentowych do otrzymywania struktur o szkielecie małych peptydów oraz ich analogów. Po raz pierwszy została opublikowana w roku 1959 przez Ivara Ugiego.⁹ Opisał on ją jako: „reakcję addycji jonów immonowych do izocyjanków połączoną z drugorzędowymi reakcjami”.



Ivar Ugi

Schemat 1. Przebieg reakcji Ugiego.

Reakcja Ugiego jest czterokomponentową kondensacją związku karbonylowego (aldehydu lub, rzadziej, ketonu), aminy (pierwszorzędowej lub drugorzędowej), kwasu karboksylowego oraz izocyjanku. Otrzymanym produktem jest α -amidoamid **I** (Schemat 1). Pomimo złożonego mechanizmu tej reakcji, wykonuje się ją według procedury „one-pot”, co niewątpliwie jest jej zasadniczą zaletą.



Schemat 2. Proponowany mechanizm reakcji Ugiego

Przyjmuje się, że w pierwszym etapie tej reakcji z aminy i aldehydu powstaje imina **A** i wydziela się cząsteczka wody (Schemat 2). Imina **A** jest następnie protonowana przez kwas karboksylowy tworząc związek **B**. Związek ten w kolejnym etapie ulega reakcji z izocyjankiem tworząc tzw. „ α -addukt” **C**. W kolejnym etapie do α -adduktu przyłączony zostaje kwas karboksylowy i powstaje produkt pośredni **D**. Ostatnim etapem jest przegrupowanie Mumma, polegające na przeniesieniu grupy acylowej z atomu tlenu na

⁹ Ugi, I., Meyr R., Fetzer, A., Steinbrueckne, C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1959**, *71*, 386

atom azotu. Jest to etap nieodwracalny, co stanowi siłę napędową reakcji (Schemat 2). Warto zauważyć, że zgodnie z tym mechanizmem, teoretycznie, oprócz produktu głównego **I**, w reakcji tworzy się dodatkowo tylko cząsteczka wody. Dlatego też reakcja Ugiego charakteryzuje się wysoką „wydajnością atomową” co bardzo dobrze wpisuje się w założenia „zielonej chemii”.

W praktyce wydajność reakcji Ugiego ściśle zależy od reaktywności stosowanych substratów. Złożoność mechanizmu reakcji oraz wieloskładnikowość mieszaniny reakcyjnej powoduje, iż podczas reakcji mogą tworzyć się inne produkty uboczne. Wśród nich wyróżnić można produkt reakcji Passeriniego.⁷ W celu otrzymania produktu z najwyższą wydajnością często zachodzi potrzeba optymalizacji warunków prowadzenia reakcji dla każdego zestawu substratów. Ze względu na jonowy charakter mechanizmu, produkt reakcji Ugiego zwykle otrzymuje się z najwyższą wydajnością w rozpuszczalnikach protycznych takich jak: metanol, etanol oraz trifluoroetanol (TFE). Znane są również przykłady reakcji Ugiego prowadzonych w wodzie.¹⁰ Rzadziej stosuje się rozpuszczalniki aprotyczne (chloroform, dimetyloformamid, chlorek metylenu, tetrahydrofuran). Na przebieg reakcji dobrze wpływa również stosowanie dużego stężenia substratów, dlatego też możliwe jest przeprowadzenie tej reakcji w wariacie bez rozpuszczalnika.¹¹

Jak wynika z mechanizmu przedstawionego na Schemacie 2, podczas etapu addycji izocyjanku do α -adduktu **C**, tworzy się nowe centrum stereogeniczne. Jeśli w środowisku nie występują czynniki stereoróżnicujące, produktem reakcji jest związek racemiczny. Stanowi to jej istotną wadę i główne ograniczenie zastosowania w syntezie związków biologicznie aktywnych. Ma to szczególne znaczenie wobec rosnących wymagań dotyczących czystości optycznej substancji w przemyśle farmaceutycznym. Wynikają one z odmiennej aktywności biologicznej poszczególnych stereoizomerów.¹² Pomimo, że od odkrycia reakcji Ugiego minęło ponad 50 lat, wciąż nie istnieją uniwersalne metody na przeprowadzenie reakcji w sposób wysoce stereoselektywny. Istnieją jednakże warianty diastereoselektywne reakcji Ugiego, które prowadzą do otrzymania produktów w postaci diastereoizomerów. Opracowano również modyfikacje reakcji Ugiego w wariacie

¹⁰ Pirrung, M. C.; Sarma, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 444

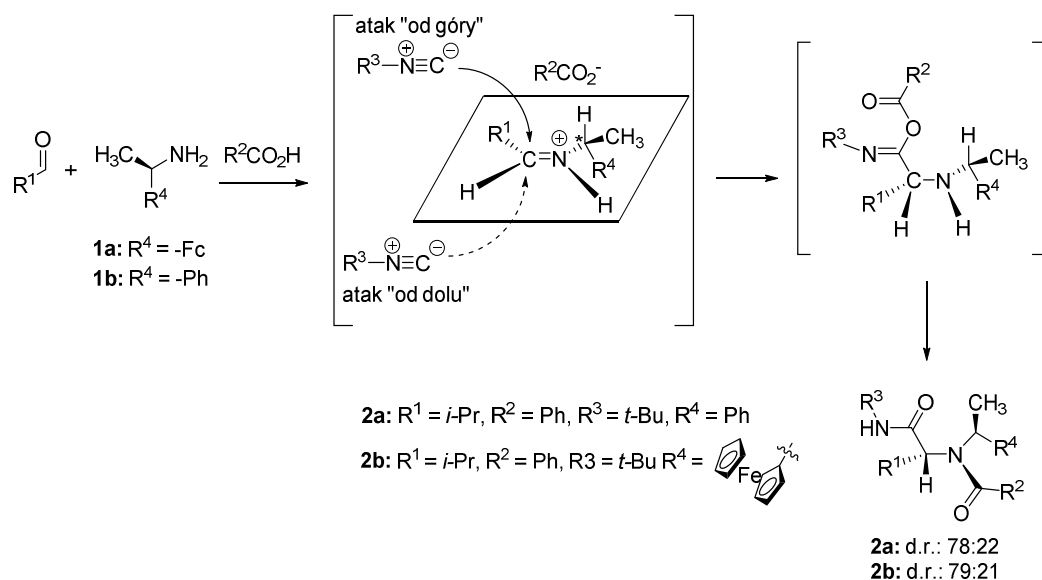
¹¹ Liu, N., Cao, S., Wu, J., Yu, J., Shen, L., Feng, X., Qian, X., *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3966

¹² Koch H.P., Czejka M.J., *J. Biosci.* **1986**, *41*, 11

enancjoselektywnym, jednak dotyczy to tylko katalitycznych, trójkomponentowych wariantów reakcji Ugiego.^{13,14}

2.1.1. Diastereoselektywne warianty reakcji Ugiego

W diastereoselektywnym wariantcie reakcji Ugiego co najmniej jeden z substratów jest stosowany w postaci enancjomerycznie czystej. Jak wynika z mechanizmu reakcji, etapem decydującym o stereoróżnicowaniu jest ten, w którym następuje atak izocyjanku na protonowaną zasadę Schiffa (Schemat 3). Obecność chiralnej grupy jednego z substratów różnicuje przestrzeń po stronie *re* i *si*, a co za tym idzie może prowadzić do powstania różnych proporcji stereoizomerów (Schemat 3). Nadmiar diastereoizomeryczny produktu jest uzależniony od tego, który z reagentów został użyty w formie optycznie czystej.¹⁵



Schemat 3. Sterechemiczny przebieg reakcji Ugiego

2.1.1.1. Reakcja Ugiego z chiralnymi aminami

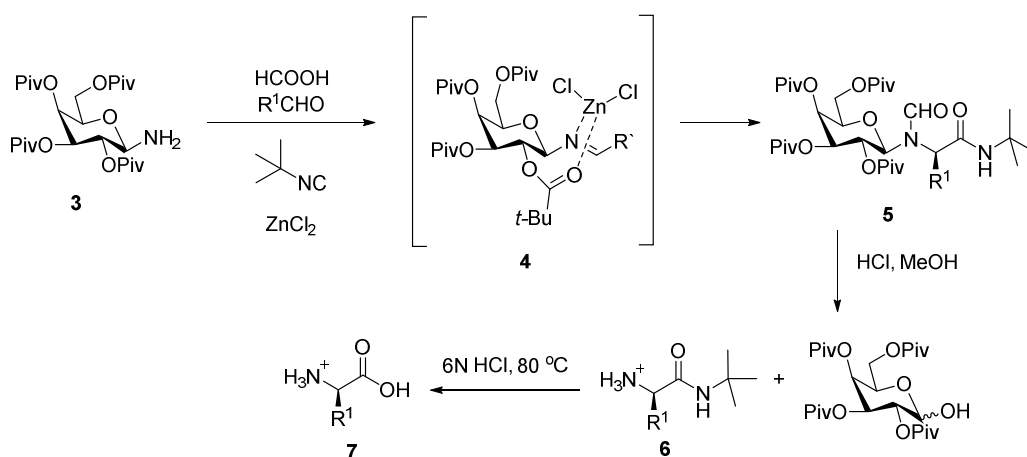
Badania wykazały, że największy wpływ na diastereoselektywność reakcji Ugiego, ma zastosowanie chiralnej aminy.¹⁵ Jednymi z pierwszych chiralnych amin zastosowanych w reakcji Ugiego były: 1-ferrocenyloetyloamina (**1a**) oraz 1-fenyloetyloamina (**1b**)

¹³ Zhao, W., Huang, L., Guan, Y., Wulff, W. D., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3436

¹⁴ Yue, T., Wang, M-X., Wang, D-X., Masson, G., Zhu, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6717

¹⁵ Ramon, D. J., Yus, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1602

(Schemat 3).¹⁶ W celu uzyskania produktów z najwyższą diastereoselektywnością, reakcje Ugiego przeprowadzano w warunkach kinetycznych, tj. w niskiej temperaturze oraz dużym rozcieńczeniu. Uzyskane wyniki wskazują, że dla przebiegu reakcji największe znaczenie ma stężenie substratów, a w mniejszym stopniu niska temperatura. Proporcje uzyskanych diastereoizomerów związków **2a** i **2b** w reakcji przeprowadzonej w temperaturze -60 °C dla dużego stężenia substratów (1M) wynosiły 1:2, natomiast w dużym rozcieńczeniu (c = 0,038 M) proporcje diastereoizomerów związków **2a,b** wynosiły ok. 1:4 dla obu omawianych amin (Schemat 3, R⁴ = Fc, R⁴ = Ph).¹⁶



Schemat 4. Synteza aminokwasów z wykorzystaniem diastereoselektywnej reakcji Ugiego z aminocukrem **3**

W kolejnym przykładzie, w reakcji Ugiego zastosowano chiralną 2,3,4,6-tetra-O-piwaloiilo- α -D-galaktozylopyranozyloaminę (**3**) (Schemat 4).¹⁷ W tym przypadku użyta amina pełniła rolę pomocnika chiralnego, gdyż była ona ostatecznie usuwana z finalnego produktu. Autorzy przeprowadzili reakcje Ugiego z różnymi aldehydami, aminą **3**, izocyjankiem *tert*-butylovym oraz kwasem mrówkowym, uzyskując pochodne **5** z wysokimi nadmiarami diastereoizomerycznymi (de>89%) (Schemat 4). Wysoką diastereoselektywność uzyskano poprzez zastosowanie dodatku kwasu Lewisa (ZnCl₂), którego postulowane działanie polega na tworzeniu kompleksu **4** z powstałą iminą (Schemat 4). Związki **5** zostały następnie poddane reakcji z kwasem solnym, w której otrzymano optycznie czyste *D*-aminokwasy **7**.

Wadą opracowanej metody była możliwość otrzymania wyłącznie jednego enancjomeru peptydomimetyku **5**, ponieważ autorzy nie dysponowali drugim enancjomerem aminocukru **3**. W późniejszych badaniach, autorzy zastosowali 2,3,4-*tri*-O-

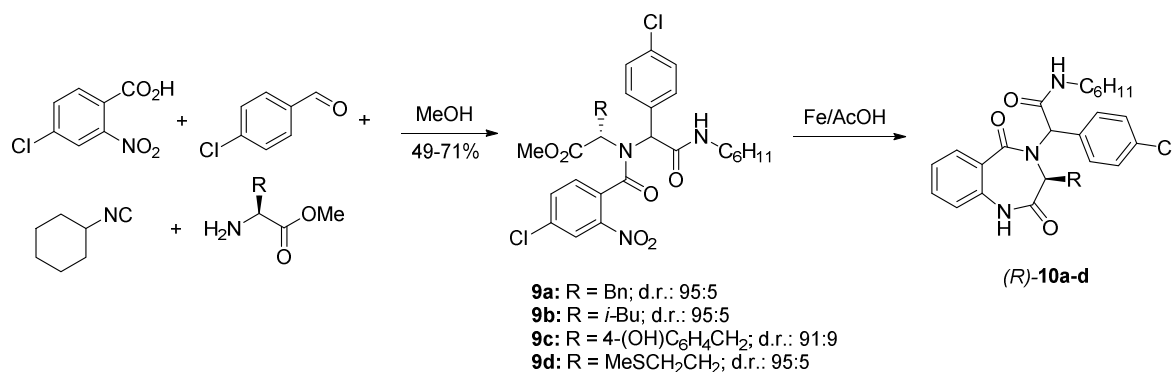
¹⁶ Marquarding, D.; Hoffmann, P.; Heitzer, H.; Ugi, I., *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1969

¹⁷ Kunz, H.; Pfrengle, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 651

piwaloilo- α -D-arabinozylopyranozoloaminę,¹⁸ co prowadziło do otrzymania produktów o przeciwnej konfiguracji. Przy zastosowaniu opisanej wcześniej ogólnej metodologii otrzymano szereg nienaturalnych aminokwasów o konfiguracji *L*.

Przeprowadzono również syntezę 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetylo-1-amino-2-deoksy- β -D-glucopyranozy, która nie zawierała grup piwaoilowych, co znacząco obniżyło masę molową pomocnika chiralnego. Wykorzystanie tej aminy również prowadziło do otrzymania szeregu peptydomimetyków z wysoką wydajnością oraz bardzo dobrymi nadmiarami diastereoizomerycznymi (>95%).¹⁹

W literaturze istnieją również przykłady zastosowania chiralnych estrów aminokwasów, które były użyte w reakcji Ugiego. W przypadku zastosowania estrów metylowych fenyloalaniny, leucyny, tyrozyny oraz metioniny produktem reakcji Ugiego był odpowiednio peptydomimetyki **9a-d**, które otrzymano z dobrymi nadmiarami diastereoizomerycznymi (>82%). Pochodne te następnie poddano redukcji, uzyskując optycznie czyste benzodiazepiny **10a-d**.²⁰



Schemat 5. Zastosowanie wariantu diastereo selektywnego reakcji Ugiego do syntezy benzodiazepin

2.1.1.2. Wybrane przykłady reakcji Ugiego z innymi niż amina chiralnymi substratami

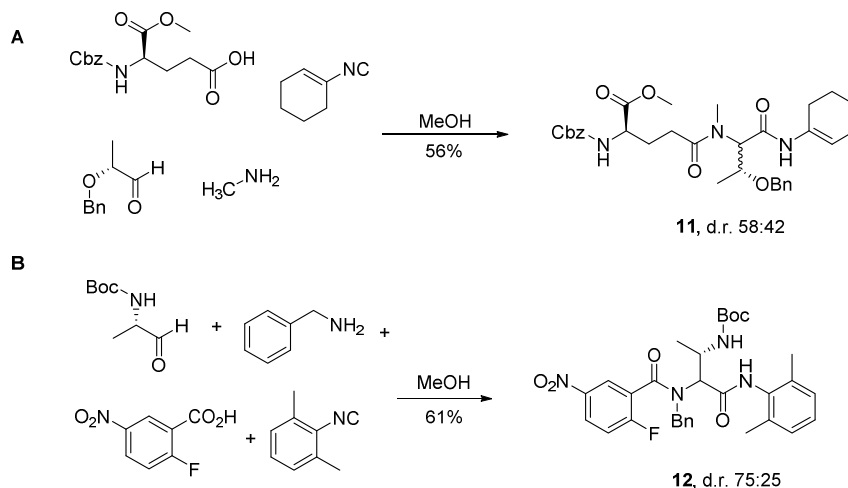
W reakcji Ugiego oprócz chiralnej aminy stosowano również chiralne aldehydy. Istotnym problemem przy zastosowaniu chiralnych aldehydów jest ich enolizacja, co w konsekwencji prowadzi do ich racemizacji. Badania nad reakcją Ugiego z optycznie czystymi 2-metylobutanalem oraz 3-fenyl-2-metylopropanalem wykazały, że racemizują one w warunkach reakcji prowadząc do mieszaniny wszystkich możliwych

¹⁸ Kunz, H.; Pfrenge, W. *Synthesis* **1991**, 1039

¹⁹ Lehnoff, S., Goebel, M., Karl, R.M., Klosel, R., Ugi I., *Ang. Chem. Int. Ed.*, **1995**, *34*, 1104

²⁰ Faggi, C.; Marcaccini, S.; Pepino, R.; Pozo, M. C. *Synthesis* **2002**, 2756

stereoizomerów.²¹ Racemizacji nie obserwowano w przypadku, aldehydów posiadających w pozycji α atom tlenu.²² Jako przykład można przytoczyć użycie jako aldehydu optycznie czynnego 2-benzylksypropionowego. Użycie tego aldehydu prowadziło do otrzymywania związku **11**, w proporcji diastereoizomerów 3:2 (Schemat 6A).^{22a} Wyższą diastereo selektywność obserwowano dla aldehydów będących analogami aminokwasów. W reakcji z Boc-alaninalem otrzymano dwa diastereoizomery związku **12** w proporcji 2:1 (Schemat 6B).^{22b}



Schemat 6. Reakcja Ugiego z chiralnymi aldehydami

Opisane w literaturze są również przykłady z zastosowaniem chiralnych, nieracemicznych izocyjanków i kwasów karboksylowych. Jednakże otrzymywane w ten sposób peptydomimetyki były mieszaniną diastereoizomerów w proporcji 1:1.¹⁵ W najlepszym z opisanych przykładów, proporcja ta nie przekraczała 3:2.^{23,24}

W literaturze opisano również przykłady reakcji Ugiego, w których jednocześnie stosowany był więcej niż jeden chiralny nieracemiczny reagent.²⁵ Jednakże wysokie nadmiary diastereoizomeryczne uzyskiwano jedynie, gdy jednym z nich była chiralna amina.²⁶ Z tego powodu jedynie chiralne aminy były do tej pory opisane, jako pomocniki chiralne do reakcji Ugiego.

²¹ C. L. Kelly, K. W. M. Lawrie, P. Morgan, C. L. Willis, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 8001

²² a) Tempest, P., Pettus, L.; Gore, V., Hulme, C. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 1947–1950 b) Bauer, S. M., Armstrong, W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 6355

²³ Hulme, C., Morrissette, M. M., Volz, F. A., Burns, C. J., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 1113

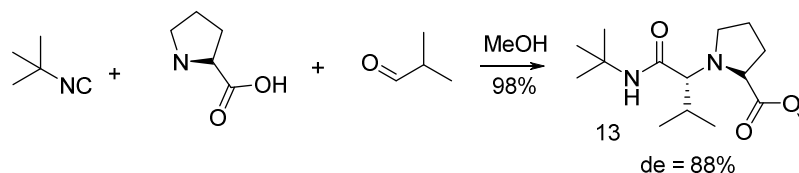
²⁴ Ziegler, T., Kaisers, H. J., Schlomer, R., Koch, C., *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 8391

²⁵ Kelly, C.L., Lawrie, K. W. M. Morgan, P., Willis, C. L., *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 8001

²⁶ a) T. Yamada, N. Motoyama, T. Taniguchi, Y. Kazuta, T. Miyazawa, S. Kuwata, K. Matsumoto, M. Sugiura, *Chem. Lett.*, **1987**, 723; b) C. Hebach, U. Kazmaier, *Chem. Commun.*, **2003**, 596

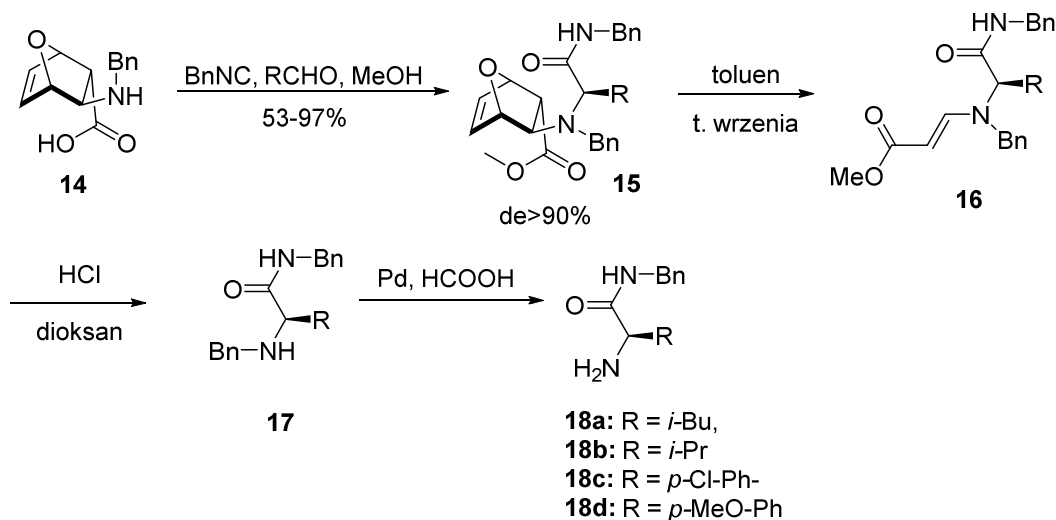
2.1.1.3. Wybrane przykłady reakcji Ugiego z nieracemicznymi aminokwasami i iminami

Reakcję Ugiego można przeprowadzić również z chiralnymi aminokwasami, tak jak to przedstawiono na Schemacie 7. Reakcja Ugiego z aminokwasami różni się od klasycznej reakcji tym, że w reakcji bierze udział również cząsteczka alkoholu (najczęściej rozpuszczalnika), a jej produktem jest związek **13**, zawierający grupę aminową i estrową.²⁷



Schemat 7. Reakcja Ugiego z aminokwasami

Wykorzystując powyższą reakcję, opracowano pomocnik chiralny o strukturze β -aminokwasu **14** do syntezy α -aminoamidów **18a-d** (Schemat 8).²⁸ W odróżnieniu od aminocukrów, fragment pomocnika był usuwany w łagodniejszych warunkach, poprzez reakcję retro-Dielsa-Aldera, w której otrzymywano związek **16**. Następnie po reakcji z kwasem solnym otrzymywano optycznie czyste *N*-alkilowane amidy **17** lub aminoamidy **18**.



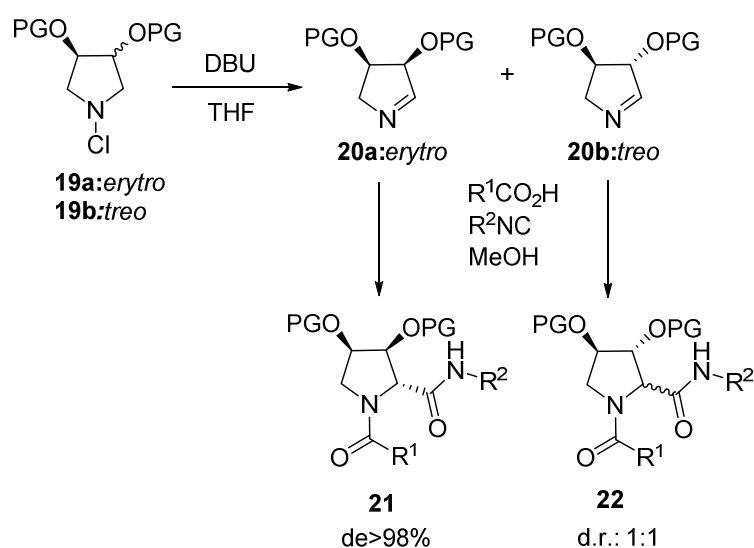
Schemat 8. Wykorzystanie chiralnego β -aminokwasu w reakcji Ugiego.

Zastosowanie aminokwasu **14** o przeciwnej konfiguracji, umożliwiło otrzymanie przeciwnych enancjomerów związków **18**.

²⁷ Demharter, A., Horl, W., Herdtweck, E., Ugi, I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, 35, 173

²⁸ Basso, A., Banfi, L., Riva, R., Guant, G., *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 2, 575

Interesujące możliwości, szczególnie w syntezie związków heterocyklicznych, stwarza trójkomponentowa reakcja Ugiego z cyklicznymi iminami.²⁹ W klasycznej wersji reakcji imina tworzona jest *in situ* z aldehydu (lub ketonu) i aminy. Iminy mogą być również bezpośrednio wprowadzane do reakcji. Tak zwana reakcja Jullie-Ugiego jest wariantem, w której jednym z substratów jest analog 1-piroliny.³⁰ Problemem w przeprowadzeniu tego typu reakcji jest nietrwałość 1-pirolin prowadząca do wielu reakcji ubocznych (np. trimeryzacji). Dlatego też pochodne te, otrzymywane są z odpowiedniej dihydropiroliny i bez wydzielania używane do reakcji Ugiego. Pochodne 1-piroliny można otrzymać poprzez eliminację chlorowodoru z N-chloro-dihydropiroliny³⁰ lub poprzez bezpośrednie utlenianie dihydropiroliny.³¹ Synteza glikomimetyków o strukturze pirolidyny z chiralnej nieracemicznej iminy **20a,b** jest przykładem diastereo selektywnego wariantu reakcji tego typu (Schemat 9).³²



Schemat 9. Reakcja Ugiego z chiralnymi iminami

W przypadku zastosowania stereoizomeru erytro **20a**, produkt reakcji **21** otrzymany był z wysokim nadmiarem diastereoizomerycznym (de > 98%). W przypadku zastosowania izomeru treo nie obserwowano indukcji asymetrycznej a związek **23** otrzymano jako równomolową mieszaninę diastereoizomerów. Autorzy niestety nie wyjaśnili zaobserwowanego zjawiska.

²⁹ Koopmanschap, G., Ruijter, Orru, R. V. A., *Beilstein J. Org. Chem.*, **2014**, *10*, 544

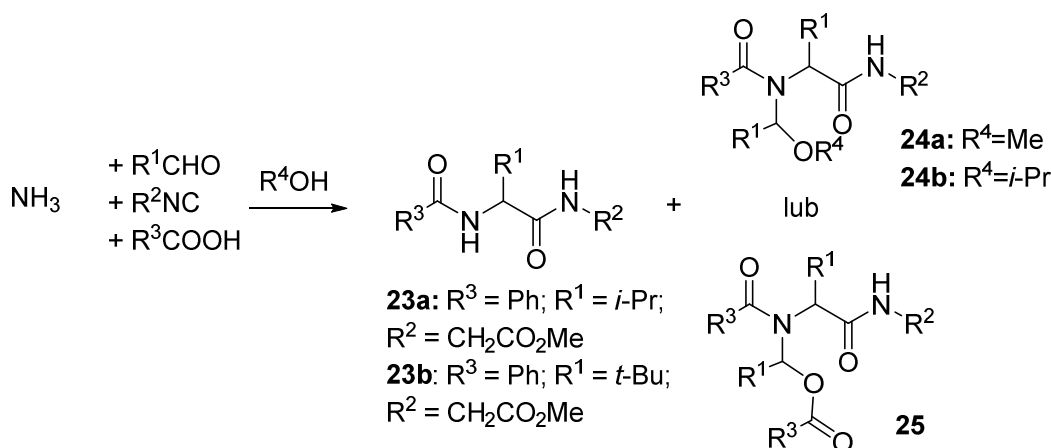
³⁰ Bowers, M. M.; Carroll, P.; Joullié, M. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1989**, 857

³¹ Ngouansavanh, T., Zhu, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5775

³² Chapman, T. M., Davies, I. G., Gu, B., Block, T. M., Scopes, D. I. C., Hay, P. A., Courtney, S. M., McNeill, L. A., Schofield, C. J., Davis, B. G., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 506

2.1.2. Reakcja Ugiego z ekwiwalentem amoniaku

Zastosowanie pierwszorzędowych amin w reakcji Ugiego prowadzi do otrzymania odpowiednio *N*-alkilowanych amidoamidów **I** (Schemat 1, $R^2 =$ alkil, aryl). Nie zawsze jednak grupa alkilowa przy atomie azotu jest pożądana w produkcji. Teoretycznie, stosując amoniak zamiast aminy pierwszorzędowej powinno być możliwe otrzymanie produktu reakcji Ugiego bez grupy alkilowej przy wiązaniu amidowym (Schemat 1, $R^2 =$ H).



Schemat 10. Reakcja Ugiego z amoniakiem

W praktyce, zastosowanie amoniaku wiąże się z szeregiem niedogodności. Hebach przeprowadził szczegółowe badania dotyczące przebiegu tej reakcji, w których wykazał, że problemy te wynikają z reaktywności imin utworzonych z cząsteczki amoniaku i aldehydu. Prowadzi to do tworzenia produktów ubocznych, a oczekiwany produkt reakcji tworzy się z niskimi wydajnościami.^{33,34,35} W standardowych warunkach, w reakcji z solą amoniową kwasu benzoowego, aldehydem izopropylowym, oraz izocyjanooctanem metylu, standardowy produkt reakcji Ugiego **23a** tworzy się z wydajnością 5%, podczas gdy głównym produktem reakcji jest związek **24a** (33% wyd.). Związek **24a** może się tworzyć z powodu relatywnie wysokiej nukleofilowości metanolu. Okazuje się jednak, że zastosowanie mniej nukleofilowego 2-propanolu prowadzi do powstawania analogicznego produktu **24b**. Dopiero zastosowanie 2,2,2-trifluoroetanolu (TFE) umożliwiło otrzymanie produktu **23a** z wydajnością 45%.³⁴ Reaktywność tworzącej się w reakcji z amoniakiem iminy może być zredukowana poprzez zastosowanie sterycznie rozbudowanego aldehydu (Schemat 10, $\text{R}^1 = t\text{-Bu}$), co prowadzi do klasycznego produktu **23b** z wydajnością >50%. W tym przypadku nie jest konieczne stosowanie TFE. W dalszych badaniach okazało się,

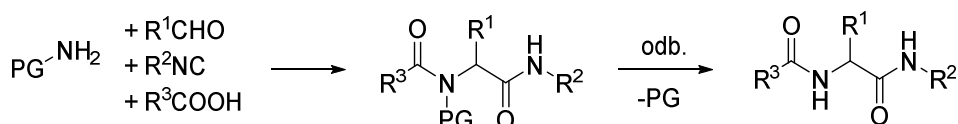
³³ Thompson, M.J., Chen, B., *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 7084

³⁴ Kazmaier, U.; Hebach, C. *Synlett* **2003**, 1591

³⁵ Pick, R.; Bauer, M.; Kazmaier, U.; Hebach, C. *Synlett* **2005**, 757

że przy zwiększonej proporcji molowej substratów względem izocyjanku, powstaje produkt sześciokomponentowej reakcji **25**.³⁵

Pomimo przedstawionych powyżej przykładów, reakcja Ugiego z użyciem amoniaku pozostaje problematyczna, przez co nie ma charakteru uniwersalnego. Z tego powodu opracowano szereg metod z zastosowaniem aminy pierwszorzędowej posiadającej grupę zabezpieczającą, która może być usunięta z finalnego produktu. Może więc ona stanowić formalny „ekwiwalent amoniaku” w reakcji Ugiiego (Schemat 11).



Schemat 11. Zastosowanie labilnych grup zabezpieczających jako ekwiwalent amoniaku

Do tego celu najczęściej używane są pochodne benzyloaminy takie jak: 4-metoksybenzyloamina (PMBA) oraz 2,4-dimetoksybenzyloamina (DMBA). W przypadku tych amin, wprowadzone do peptydu grupy 4-metoksybenzyloowa oraz 2,4-dimetoksybenzyloowa mogą być usunięte z wykorzystaniem kwasu trifluorooctowego (TFA).^{36,37,38,39}

Dobrym przykładem takiej strategii jest synteza inhibitora proteasomu – MG-132 (**28**) (Schemat 12). W tym przykładzie, w reakcji Ugiiego otrzymano diastereoizomery związku tripeptydu **26** (d.r.: 1:1), z wiązaniem amidowym zabezpieczonego grupą 2,4-dimetoksybenzyloową. Po rozdzieleniu stereoizomerów związek **26** odbezpieczono za pomocą kwasu trifluorooctowego, otrzymując czyste optycznie stereoizomery **27** z bardzo dobrymi wydajnościami (>90%). Otrzymane w ten sposób związki zostały następnie przekształcone w stereoizomery związku MG-132 (**28**).³⁶ Opracowana metoda umożliwiła otrzymanie wszystkich ośmiu stereoizomerów, które nie zostały wcześniej otrzymane z uwagi na wieloetapową syntezę klasycznymi metodami sprzęgania. Badania nad wpływem budowy przestrzennej tych związków na aktywność względem proteasomu wykazały, że dotychczas opisywany stereoizomer MG-132 nie był najbardziej aktywnym inhibitorem proteasomu spośród otrzymanych stereoizomerów.

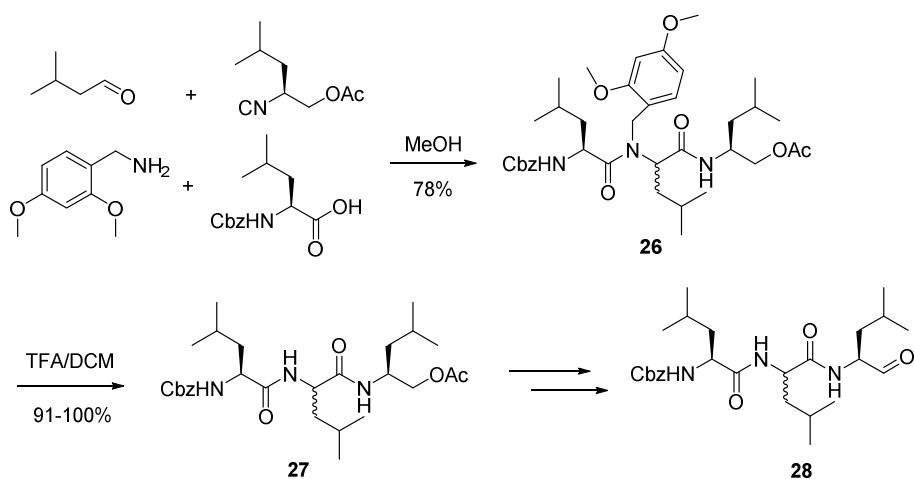
³⁶ Mroczkiewicz, M.; Winkler, K.; Nowis, D.; Placha, G.; Golab, J.; Ostaszewski, R. *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 1509

³⁷ Costa, S. P. G.; Maia, H. L. S.; Pereira-Lima, S. M. M. A. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 1475

³⁸ Sheehan, S. M.; Masters, J. J.; Wiley, M. R.; Young, S. C.; Liebeschuetz, J. W.; Jones, S. D.; Murray, C. W.; Franciskovich, J. B.; Engel, D. B.; Weber, W. W.; Marimuthu, J.; Kyle, J. A.; Smallwood, J. K.; Farnen, M. W.; Simth, G. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2255

³⁹ Thompson, M. J.; Chen, B. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 5324





Schemat 12. Wykorzystanie 2,4-dimetoksybenzylaminy w reakcji Ugięgo do syntezy wszystkich diastereoizomerów MG-132

2-Nitrobenzylamina⁴⁰ oraz 4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylamina⁴¹ były również z powodzeniem zastosowane do syntezy analogów peptydów w reakcji Ugięgo. Fragmenty tych amin mogą być usuwane z finalnego peptydomimetyku fotochemicznie.

Podsumowując, przedstawiona metodologia jest skutecznym narzędziem do otrzymywania analogów peptydów i jest mniej problematyczna od reakcji z użyciem amoniaku. Ponadto, reakcję usunięcia fragmentu pochodzącego od aminy często można przeprowadzić według procedury „one-pot” z zadowalającymi wydajnościami sumarycznymi.³⁹

2.1.3. Reakcja Ugięgo z izocyjankiem modyfikowalnym

Kolejną z metod rozszerzenia możliwości reakcji multikomponentowych jest zastosowanie koncepcji zwanej: „drugorzędową modyfikacją produktów” reakcji Ugięgo.⁴² Znakomitym przykładem wykorzystania tej strategii jest zastosowanie tzw. „izocyjanku modyfikowalnego” (ang: *convertible isocyanide*), który może być transformowany w inne grupy funkcyjne w finalnym produkcie. Najszerszej stosowany w tym celu jest izocyjanek cykloheksylidenowy (**29**), który może być otrzymany cykloheksanonu w trzyetapowej syntezie.⁴³ Stosując ten izocyjanek, otrzymuje się dipeptyd **30** posiadający grupę amidową połączoną z pierścieniem cykloheksylidenowym. W zależności od dodatku odpowiedniego nukleofila, grupę tę można transformować z użyciem kwasów w kierunku różnych grup

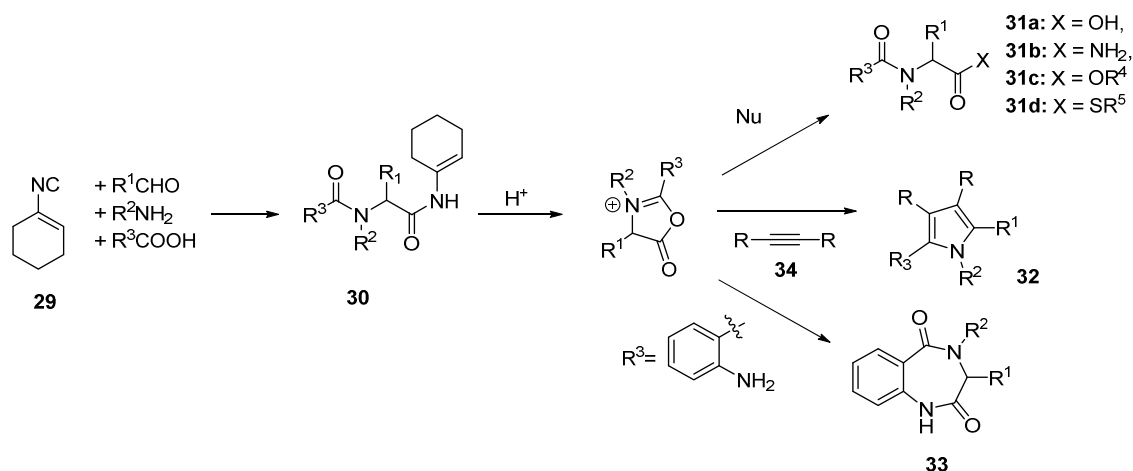
⁴⁰ Sung, K., Chen, F-L, Huang, P-C., *Synlett*, **2006**, 2667

⁴¹ Bayer, T.; Riemer, C.; Kessler, H. *J. Pept. Sci.*, **2001**, 7, 250

⁴² Domling, A., Wang, W., Wang, K., *Chem. Rev.*, **2012**, 112, 3083

⁴³ Maison, W., Schlemminger, I., Westerhoff, O., Martens, J., *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 8, 1343

cyklicznych i acyklicznych (Schemat 13).⁴⁴ W celu otrzymania kwasów karboksylowych **31a**, grupę cykloheksylidenową usuwa się stosując wodny roztwór kwasu solnego.



Schemat 13. Zastosowanie modyfikowalnego izocyjanku do syntezy peptydomimetyków, pirolu i benzodiazepin

Prowadzenie tej reakcji w środowisku bezwodnym (np. kwas trifluorooctowy w THF) prowadzi do otrzymania peptydomimetyku **31b**, z grupą amidową. Natomiast dodatek alkoholi do środowiska reakcji umożliwia otrzymanie związków **31c** z grupami estrowymi (MeO-, *t*-BuO-, EtO-). Stosując izocyjanek cykloheksylidenowy można również otrzymać tioestry **31d** (Schemat 13).

Możliwość prostego odbezpieczenia grupy cykloheksylidenowej została również wykorzystana do przeprowadzenia reakcji Ugiego na fazie stałej. Żywica z immobilizowanym izocyjankiem **29**, została użyta w reakcji co prowadziło do powstania peptydów na powierzchni fazy stałej. Po mechanicznym oddzieleniu fazy stałej od mieszaniny reakcyjnej, otrzymane związki zostały następnie odłączone od żywicy przy użyciu TFA.⁴⁵

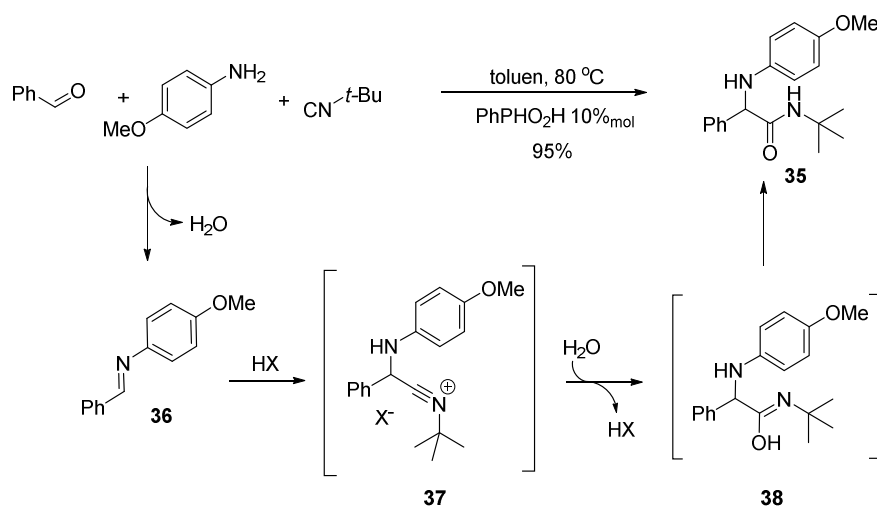
Izocyjanek **29** był też zastosowany do syntezy związków heterocyklicznych. Przeprowadzając reakcję usunięcia grupy cykloheksylidenowej w obecności dipolarofila **34** otrzymano związek **32** o budowie pirolu (Schemat 13). W innym przykładzie izocyjanek **29** został zastosowany wraz z kwasem 2-aminobenzoowym jako substraty do reakcji Ugiego. Usunięcie grupy cykloheksylidenowej prowadziło do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, w wyniku której tworzyła się odpowiednia benzodiazepina **33**.⁴⁴

⁴⁴ Keating, T.A., Armstrong, R.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *118*, 2574

⁴⁵ Hulme, C., Ma, L., Cherrier, M-P., Romano, J.J., Morton, G., Duquenne, C., Salvino, J., Labaudiniere, R., *Tetrahedron Asymm.*, **2000**, *41*, 1883

2.1.4. Katalityczne warianty reakcji Ugiego

W ostatnich latach opisano wariant trójkomponentowych reakcji Ugiego. W wariacie tym, zamiast kwasu karboksylowego zastosowano kwasy Brønsteda, będące katalizatorami tej reakcji. Przykładem takiej reakcji jest trójkomponentowa kondensacja aldehydu, aminy oraz izocyjanku prowadząca do otrzymania α -aminoamidów **35** (Schemat 14). Najlepszym katalizatorem tej reakcji okazał się kwas fenylofosfinowy.⁴⁶ Autorzy udowodnili, że ten wariant reakcji ma charakter uniwersalny i można go przeprowadzić dla szeregu aldehydów, amin oraz izocyjanków, zarówno z podstawnikami aromatycznymi jak i alifatycznymi.



Schemat 14. Katalityczna reakcja Ugiego

Kolejne modyfikacje tej reakcji polegały na zastosowaniu innych katalizatorów. Kwas borowy katalizował podobną reakcję dla aldehydów i amin aromatycznych w wodzie.⁴⁷ W przypadku trójkomponentowej reakcji 6-aminofenolu z izocyjankiem i aldehydem, możliwe jest użycie chlorku cynku lub sulfonowanej celulozy jako katalizatorów.^{48,49}

W katalitycznych reakcjach typu Ugiego bardzo istotna w przebiegu reakcji jest rola wody. Podobnie jak w klasycznej reakcji, w wariacie trójkomponentowym również tworzy się imina **36** z wydzieleniem cząsteczki wody. W czterekomponentowej reakcji Ugiego, woda była produktem ubocznym a kwas karboksylowy pełnił rolę nukleofila. Natomiast w omawianym wariacie katalitycznym, kwas jest katalizatorem a rolę nukleofila pełni cząsteczka wody, która ulega addycji do α -adduktu **37** (Schemat 14). W

⁴⁶ Pan, S. C., List, B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 3622

⁴⁷ Kumar, A., Saxena, D., Kumar-Gupta, M., *RSC Adv.*, **2013**, *3*, 410

⁴⁸ Shaabani, A., Keshipour, S., Shaabani, S., Mahyari, M., *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 1641

⁴⁹ Mofakham, H., Hezarkhani, Z., Shaabani, A., *J. Mol. Catal. A* **2012**, *360*, 26

tym wypadku w mechanizmie reakcji nie występuje przegrupowanie Mumma a etapem nieodwracalnym jest tautomerizacja wiązania amidowego w związku **38**.

2.1.5. Podsumowanie rozdziału

W rozdziale 2 przedstawiono multikomponentową reakcję Ugięgo i wybrane przykłady jej zastosowania do syntezy peptydomimetyków. W rozdziale pokazano, że reakcja Ugięgo jest dogodnym narzędziem w konstruowaniu szkieletów zawierających wiązania amidowe. Jednocześnie przedstawiono główne ograniczenie tej reakcji polegające na braku stereoselektywności. Przedstawiono przykłady diastereoselektywnych wariantów reakcji Ugięgo, w tym reakcje z chiralnymi aminami. Pomimo, że w reakcjach tych otrzymywano peptydomimetyki z dobrymi nadmiarami diastereoizomerycznymi, nie były one wykorzystane do syntezy nieracemicznych peptydomimetyków z pojedynczym centrum stereogenicznym.

Przedstawiono możliwości modyfikowania produktów reakcji Ugięgo, co umożliwia syntezę nowych związków, o zróżnicowanej budowie bez konieczności stosowania wieloetapowej syntezy. Opisano również wybrane modyfikacje klasycznej reakcji Ugięgo, które rozszerzają możliwości jej aplikacji w syntezie organicznej.

Przytoczone możliwości wykorzystania reakcji Ugięgo uzasadniają wybór tej reakcji do syntezy nowych związków biologicznie aktywnych. Równocześnie pokazano konieczność opracowania nowych metod prowadzących do otrzymania nieracemicznych peptydomimetyków.

3. Enzymy, jako naturalne katalizatory „nienaturalnych” reakcji

Procesy katalityczne to jedne z najbardziej efektywnych procesów stosowanych w przemyśle. Optymalny katalizator powinien cechować się: wysoką wydajnością, niską ceną oraz selektywnością. Wskazane jest dodatkowo aby katalizator był biodegradowalny oraz kompatybilny ze środowiskiem wodnym. Wszystkie te wymagania, mogą spełnić katalizatory występujące naturalnie - enzymy.

Enzymy są to struktury białkowe, które mają zdolność przyspieszania reakcji chemicznych. Występują one w każdym żywym organizmie, sterują procesami życiowymi i umożliwiają prawidłowe funkcjonowanie komórki. Izolacja enzymów z komórek sprawiła, że służą one od wielu dekad jako naturalne katalizatory reakcji chemicznych. Co ważne, biokatalizatory są często równie efektywne w środowisku wodnym jak i w rozpuszczalnikach organicznych. Rosnące znaczenie enzymów syntezie organicznej związane jest głównie z ich wysoką selektywnością. Jako katalizatory homochiralne, są one często używane do syntezy związków o wysokiej czystości optycznej.^{50,51} Niewątpliwą zaletą biokatalizatorów jest również ich chemoselektywność, co ogranicza powstawanie produktów ubocznych. Enzymy są też na ogół efektywne w łagodnych warunkach temperatury i ciśnienia.⁵² Obecnie, dzięki technikom modyfikacji enzymów (np. poprzez mutacje) znacznie rozszerzają się możliwości ich stosowania w syntezie organicznej. Biokataliza może być zastosowana do całego spektrum reakcji, również tych, z pozoru nienaturalnych reakcji jak redukcja wiązań podwójnych⁵³ czy reakcji Dielsa-Aldera.⁵⁴

3.1. Enzymy jako katalizatory do rozdziału kinetycznego enancjomerów

Jak wspomniano wcześniej, enzymy są katalizatorami stereoselektywnymi, a co za tym idzie z różną prędkością katalizują reakcję z poszczególnymi stereoizomerami substratu. Tę cechę enzymów szeroko wykorzystuje się do rozdziału kinetycznego enancjomerów w mieszaninie racemicznej (*ang.* kinetic resolution, KR). Enancjoselektywność enzymów wynika z różnicy w energii aktywacji powstawania kompleksu enzym-enancjomer A- [EA][‡] oraz enzym-enancjomer B – [EB][‡] (Rycina 1), co

⁵⁰ Faber, K., "Biotransformations in Organic Chemistry", Springer-Verlag, Berlin, 2004

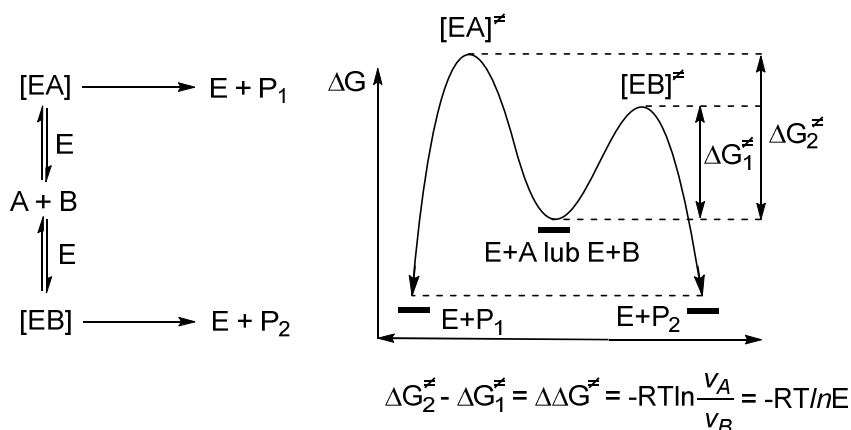
⁵¹ Bornscheuer, U., T., Kazlauskas, R. J., "Hydrolases in Organic Synthesis: Stereoselective Biotransformations" Wiley VCH, Weinheim, 2006.

⁵² H. Drauz, M. Waldman, "Enzyme Catalysis In Organic Synthesis" Wiley-VCH, Weinheim, 2002

⁵³ Yanto, Y., Winkler, C. K., Lohr, S., Hall, M., Faber, K., Dommarius, A.S., *Org. Lett.*, 2011, 13, 2540

⁵⁴ Kim, H. J., Ruszczycky, M. W., Choi, S-H., Liu, Y-N., Liu, H-W., *Nature*, 2011, 473, 109

w konsekwencji prowadzi do różnicy w szybkości tworzenia się enancjomerów produktu P₁ i P₂. Im większa jest różnica w energii aktywacji ΔG_1^\ddagger i ΔG_2^\ddagger , tym większa jest enancjoselektywność enzymu E, określana jako stosunek prędkości reakcji związku A i B (odpowiednio v_A oraz v_B). Teoretycznie, już bardzo mała wartość $\Delta\Delta G = 4.5$ kcal/mol może prowadzić do powstawania jednego z enancjomerów P w formie optycznie czystej (ee>99%).⁵⁰



Rycina 1. Rozkład energii dla enancjoselektywnej reakcji enzymatycznej t. E - enzym; A ,B - enancjomeryczne substraty, P₁,P₂ - enancjomeryczne produkty, v_A - prędkość powstawania produktu P₁, v_B - prędkość powstawania produktu P₂.

Istotnym ograniczeniem kinetycznych rozdziałów jest wydajność, która nie może przekroczyć 50%. Istnieje jednak modyfikacja enzymatycznego KR, w której podczas reakcji, dochodzi do racemizacji substratów. Dzięki temu, transformowany enancjomer jest stale odtwarzany poprzez racemizację drugiego z nich (np. poprzez zastosowanie metali przejściowych). Metoda ta, nazywana dynamicznym rozdziałem kinetycznym teoretycznie pozwala na uzyskanie optycznie czystego produktu z wydajnością 100%.⁵⁵ Aby jednak dynamiczny rozdział był efektywny, musi być spełniony szereg warunków związanych z procesem racemizacji, które czasem mogą stanowić ograniczenie tej metody.

3.2. Zastosowanie enzymatycznego rozdziału kinetycznego w syntezie chiralnych amin pierwszorzędowych

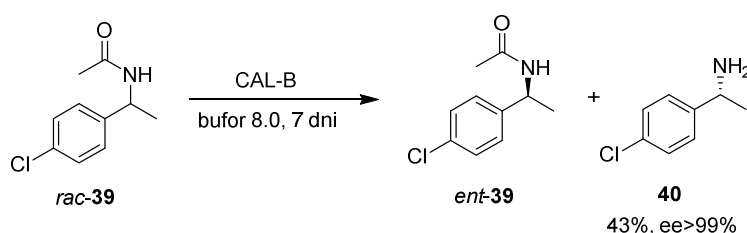
Jak pokazano w sekcji (2.1.1) chiralne, pierwszorzędowe aminy są szeroko wykorzystywane w diastereoselektywnym wariacie reakcji Ugiego. Oprócz tego, są niezwykle przydatnymi blokami budulcowymi oraz ważnymi związkami pośrednimi

⁵⁵a) Reetz, M.T., Schimossek K., *Chimia*, 1996, 50, 668; b) Paetzold, J., Bäckvall, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17620

w syntezie pochodnych amin, które bardzo często posiadają silną aktywność biologiczną (np. muskaryna lub tzw. „serum prawdy” – skopolamina). Spośród licznych metod syntezy chiralnych amin, bardzo ważną część zajmują metody enzymatyczne.⁵⁶ Wśród metod enzymatycznych, wyróżnić można trzy główne podejścia syntetyczne polegające na: enzymatycznej hydrolizie amidów, amidowaniu estrów (katalizowane przez hydrolazy) oraz poprzez reakcję utleniania amin (katalizowaną przez transaminazy).

3.2.1. Rozdział kinetyczny racemicznych amin z wykorzystaniem hydrolaz

W przypadku hydrolizy amidów, naturalnymi enzymami katalizującymi tę reakcję są amidazy (EC 3.5.1.4.). Jednak to lipazy (EC 3.1.1.3), z racji swojej dostępności, są najczęściej wykorzystywane do rozdziału kinetycznego amidów w reakcji hydrolizy. Przykładem takiego rozdziału jest opracowana przez firmę Bayer metoda hydrolizy racemicznego amidu **39**, prowadząca do optycznie czystej α -(4-chlorofenyl)etyloaminy (**40**). Reakcję tę katalizowała lipaza z *Candida antarctica* (CAL-B) (Schemat 15).⁵⁷



Schemat 15. Enzymatyczny rozdział kinetyczny przez hydrolizę amidów

Lipaza z *Candida antarctica* może być również wykorzystana w reakcji acylowania amin (Schemat 16). CAL-B katalizuje acylowanie wielu amin wykorzystując różne donory grupy acylowej. Jednym z nich może być octan etylu, który zastosowano podczas enzymatycznego rozdziału kinetycznego pochodnych fenylopropargiloamin **41**⁵⁸ oraz amin o strukturze **42** (Schemat 16).⁵⁹ Rozdział kinetyczny racemicznych amin **rac-41** zachodził z bardzo dobrą konwersją (48-49%), prowadząc do otrzymania optycznie czystego amidu **43**. Nieprzerogowaną aminę **ent-41**, z dobrymi nadmiarami enancjomerycznymi (ee>88%) odzyskiwano z mieszaniny reakcyjnej. W przypadku związków selenoorganicznych, w reakcji enzymatycznej tworzył się enancjomerycznie czysty amid **44** przy konwersji na

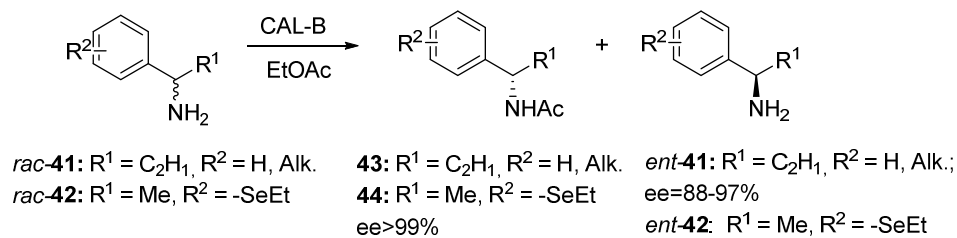
⁵⁶ Monografia na temat chiralnych amin: Nugent, T.C., “Chiral amine synthesis”, Wiley VCH, Weinheim, **2010**

⁵⁷ Smidt, H., Fischer, A., Fischer, P., Schmid, R.D., Stelzer, U., **1996**, Patent DE:19507217

⁵⁸ Messina, F., Botta, M., Corelli, F., Schneider, M.P., and Fazio, F. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 3767

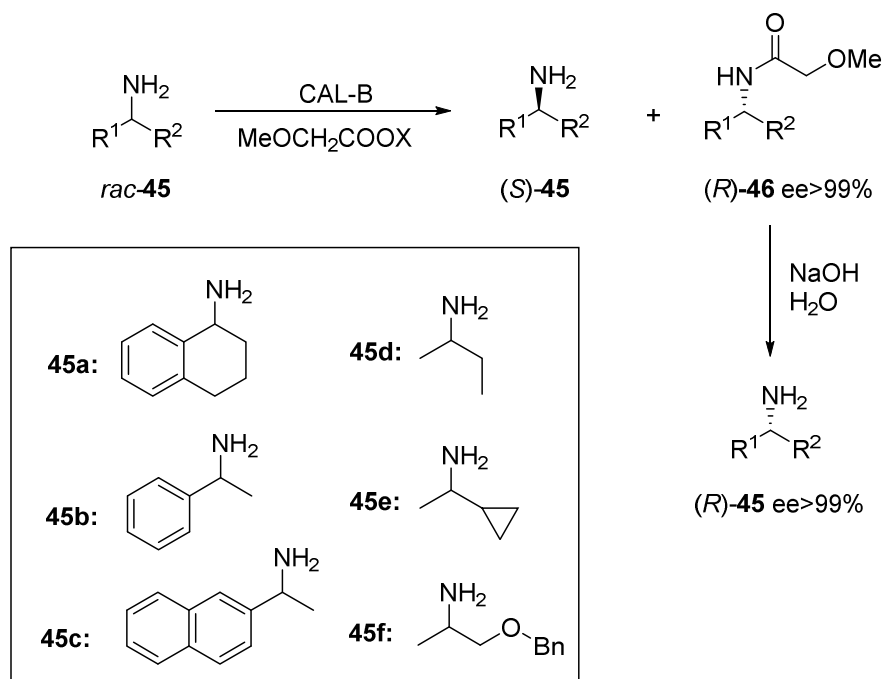
⁵⁹ Andrade, L.H. and Silva, A.V. *Tetrahedron: Asymm.*, **2008**, *19*, 1175

poziomie 18-29%. Amid ten następnie chemicznie hydrolizowano, otrzymując chiralne, nieracemiczne aminy.



Schemat 16. Reakcja acylowania amin z wykorzystaniem lipazy z *Candida antarctica*

Innymi donorami grupy acylowej stosowanymi w rozdziałach kinetycznych amin pierwszorzędowych były estry kwasu metoksyoctowego. Ester ten, wykorzystwała firma BASF do opracowania ogólnej (ponad 25 przykładów amin alifatycznych i aromatycznych) metody syntezy chiralnych, nieracemicznych amin pierwszorzędowych **45** za pomocą EKR (Schemat 17).⁶⁰



Schemat 17. Rozdział kinetyczny z użyciem estrów kwasu metoksyoctowego

Wykorzystanie metoksyoctanu izopropylu (Schemat 17, X – 2-propyl) ogranicza spontaniczną (nieenzymatyczną) reakcję amidowania, prowadzącą do racemicznego produktu. Uzyskane tą metodą aminy charakteryzowały się wysoką czystością optyczną. Firma BASF wykorzystuje tak opracowaną metodę do syntezy chiralnych amin w skali

⁶⁰ Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Sturmer, R., Zelinski, T. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, 43, 788

3000 ton/rok. Dodatkowa efektywność uzyskana była dzięki racemizacji drugiego z enancjomerów i jego ponownemu wykorzystaniu. Co więcej, metoda daje dostęp do obydwu enancjomerów aminy, ponieważ reakcja hydrolizy amidu **46** zachodzi bez racemizacji aminy. Oprócz metoksyoctanu izopropylu, do reakcji stosowany był również tańszy metoksyoctan metylu (Schemat 17, X = Me).⁶¹

Opisane powyżej przykłady pokazują, że wykorzystanie hydrolaz w syntezie chiralnych, nieracemicznych amin jest metodą bardzo efektywną i można ją stosować w skali przemysłowej. Wpływ na to ma dostępność enzymów (Novozym 435) oraz donorów grupy acylowej (np. octan etylu). Niekiedy jednak, reakcja spontanicznego, nieenzymatycznego amidowania estrów, konkuruje z reakcją enzymatyczną, co obniża czystość optyczną produktu. W wielu przypadkach, konieczny jest więc każdorazowy dobór odpowiedniego donora grupy acylowej oraz odpowiednich warunków reakcji. Metody niezawarte z niniejszym rozdziałem zostały kompleksowo przedstawione w przeglądzie [60].

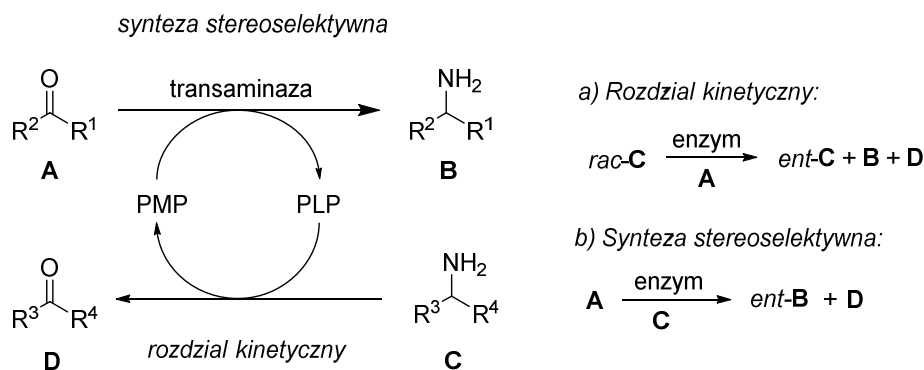
3.2.2. Rozdział kinetyczny racemicznych amin z wykorzystaniem transaminaz

Do rozdziału kinetycznego amin pierwszorzędowych można również zastosować transaminazy (grupa aminotransferaz EC 2.6.1.X) – enzymy katalizujące przeniesienie grupy aminowej na związek karbonylowy.⁶² Enzymy te wymagają zastawania kofaktora – fosforanu 5'-pirydoksalu (PMP).

Opisano dwa podejścia syntezy chiralnych amin z wykorzystaniem transaminaz: rozdział kinetyczny oraz stereoselektywną syntezę amin (Schemat 18). W pierwszym podejściu, używając mieszaniny racemicznej aminy **C**, przeprowadza się selektywnie jeden z enancjomerów aminy w związek karbonylowy **D**, natomiast drugi enancjomer aminy pozostaje nieprzereagowany. Drugie podejście umożliwia stereoselektywną syntezę amin. Z prochiralnego związku karbonylowego **A**, otrzymywana jest czysta optycznie amina **B**, zaś amina **C** pełni w tym podejściu rolę donora grupy aminowej. W przypadku rozdziału kinetycznego występuje ograniczenie związane z maksymalną wydajnością reakcji, natomiast przy stereoselektywnej syntezie amin, problemem może być równowaga chemiczna przesunięta w kierunku ketonu **A**.

⁶¹ Ismail, H., Lau, R. M., Rantwijk van, F., Sheldon, R.A., *Adv. Synth. Catal.*, **2008**, 350, 1511

⁶² Koszelewski, D., Tauber, K., Faber, K., Kroutil, W., *Trends in Biotech.*, **2010**, 28, 324



Schemat 18. Wykorzystanie transaminaz do syntezy chiralnych amin: a) Rozdział kinetyczny – związek karbonylowy jako reagent, b) Synteza stereoselektywna – związek karbonylowy jako prochiralny substrat. PMP – fosforan 5' pirydoksalu, PLP – pirydoksalamina

Przykładem zastosowania tych enzymów w rozdziale kinetycznym amin pierwszorzędowych jest reakcja opracowana przez firmę Calgene.⁶³ Wykorzystano w niej aldehyd propionowy jako akceptor grupy aminowej (A). W reakcji powstawała propyloamina (B), związek karbonylowy (D) oraz nieprzereagowany enancjomer aminy (C). Ograniczeniem tej metody jest konieczność zastosowania środowiska wodnego, co w przypadku hydrofobowych substratów stwarza konieczność zwiększenia objętości reakcji.

W celu zwiększenia efektywności rozdziału kinetycznego z zastosowaniem transaminaz, stosuje się system przesuwały równowagę reakcji w kierunku tworzenia się enancjomerycznie czystej aminy. Podczas tych reakcji jeden z produktów reakcji (amina lub keton) jest usuwany z reakcji. Na Schemacie 19 przedstawiono dwa przykłady takich systemów użytych w reakcji z porogronianem, który jest często stosowanym akceptorem grupy aminowej.⁶²

W pierwszym z tych systemów polega na odtwarzaniu pirogronianu, będącego akceptorem grupy aminowej z tworzącej się alaniny. Stosuje się w tym celu proces enzymatyczny, w którym stosuje się m. in. α -transaminazy. (Schemat 19A). Dodatkową zaletą tego systemu jest możliwość stosowania katalitycznych ilości pirogronianu, dzięki czemu unika się inhibicji transaminazy przez ten związek.⁶⁴

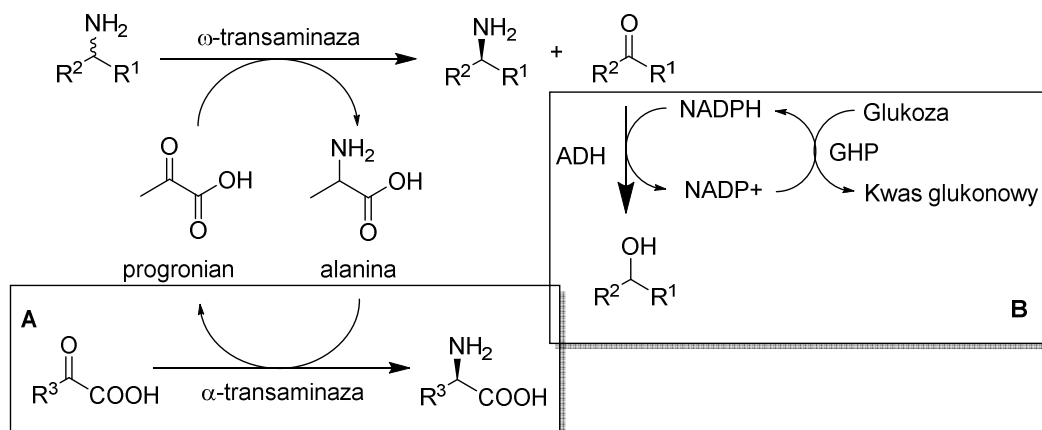
W drugim z przedstawianych systemów, w celu przesunięcia równowagi usuwano powstający keton. Ketony utworzone z lotnych amin, np. 2-butyloaminy, mogą być usuwane poprzez odparowanie.⁶⁵ W przypadku mniej lotnych ketonów, stosuje się bardziej złożony układ, polegający na enzymatycznej redukcji powstałego ketonu do alkoholu

⁶³ Matcham, G.W., Bowen, A.R.S. *Chim. Oggi*, **1996**, 14, 20

⁶⁴ Cho, B.K., Cho, H.J., Park, S.H., Yun, H., Kim, B.G., *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 81, 783

⁶⁵ Yun, H., Cho, B. K., Kim, B.G., *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 87, 772

(Schemat 19B). Do tego celu wykorzystano dehydrogenazę alkoholową (ADH). System ten komplikuje fakt, że konieczne jest odtwarzanie zużywanego podczas redukcji NADPH. Wymaga to dodatkowej reakcji enzymatycznej w której glukoza utleniana jest do kwasu glukonowego w reakcji katalizowanej dehydrogenazą glukozy.⁶⁶



Schemat 19. Systemy przesuujące równowagę w reakcjach transaminaz. A: usuwanie związku karbonylowego, B: Odtwarzanie pirogronianu

Dzięki przedstawionym powyżej systemom wykorzystującym transaminazy otrzymano wiele istotnych w przemyśle farmaceutycznym amin w formie optycznie czystej. W niniejszym rozdziale przedstawiono jedynie wybrane przykłady użycia transaminaz. Duża liczba metod z ich wykorzystaniem zostały szczegółowo zestawione w artykule przeglądowym [67].

3.3. Metody chemoenzymatyczne wykorzystujące reakcję Ugiego

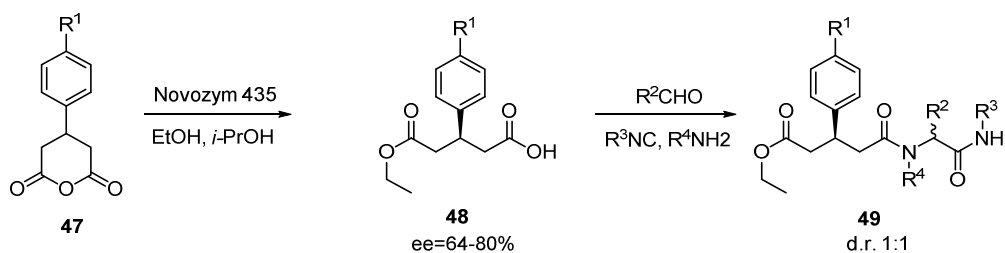
W sekcji 1.1. opisano reakcję Ugiego jako wygodne narzędzie w syntezie peptydomimetyków. Połączenie tej reakcji z metodami biokatalitycznymi pozwala na wykorzystanie zalet obydwu metod, szczególnie w syntezie nieracemicznych związków.

Przykładem wykorzystania lipaz w kombinacji z reakcją Ugiego jest enzymatyczna desymetryzacja bezwodników glutarowych, które bezpośrednio wprowadzane były do reakcji Ugiego (Schemat 20). W wyniku monoestryfikacji enzymatycznej bezwodnika **47** otrzymywano monokwasy **48** z nadmiarami enancjomerycznymi ee=63-88%, które następnie zastosowane były w reakcji Ugiego. Opracowana metoda była wykorzystana do syntezy szeregu nieracemicznych peptydomimetyków **49** (Schemat 20).⁶⁸

⁶⁶ Yun, H., Yang, Y. H., Cho, B. K., Hwang, B., Y., Kim, B.G, *Biotechnol. Lett.* **2003**, 25, 809

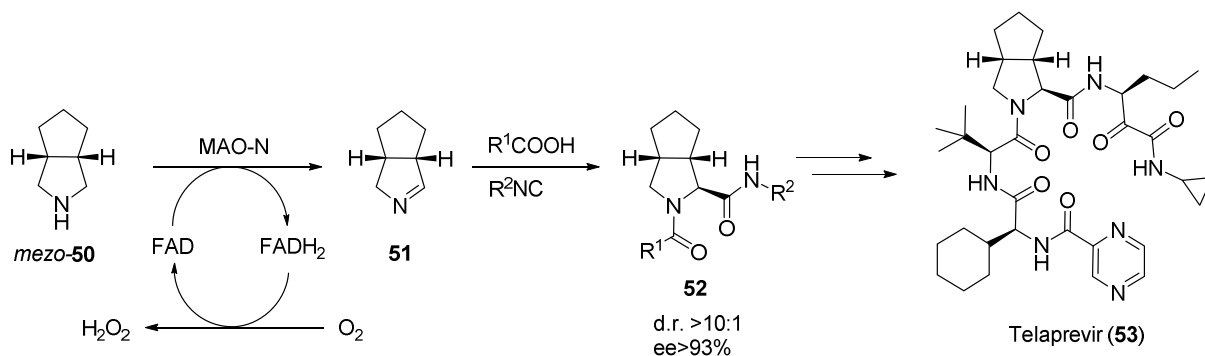
⁶⁷ Simon, R.C., Richter, N., Busto, E., Kroutil, W., *ACS Catal.* **2014**, 4, 129

⁶⁸ Ostaszewski, R.; Portlock, D. E.; Fryszkowska, A.; Jeziorska, K. *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75, 413



Schemat 20. Asymetryczna monoestryfikacja bezwodników z wykorzystaniem lipazy oraz następcza reakcja Ugiego

Interesującym przykładem takiej strategii jest opracowana przez Orru synteza telapreviru (**53**), inhibitora proteazy wirusa żółtaczk typu C.⁶⁹ Autorzy wykorzystali enzymatyczną metodę syntezy pirolin **51** z użyciem monoaminooksydazy z *Aspergillus niger* (MAO-N) opracowaną wcześniej przez Nicholasa Turnera (Schemat 21).⁷⁰ Forma *mezo* aminy **50** była utleniana z wykorzystaniem kofaktora FAD przez transformowane komórki *Aspergillus niger*. Otrzymana cykliczna imina **51** została następnie użyta w reakcji Ugiego z kwasem karboksylowym oraz izocyjankiem. Dzięki zastosowaniu specjalnie przygotowanego kwasu oraz izocyjanku było możliwe otrzymanie tą metodą Telapreviru z ogólną wydajnością wszystkich etapów 45%.



Schemat 21. Strategia chemoenzymatycznej syntezy Telapreviru z wykorzystaniem reakcji Ugiego.

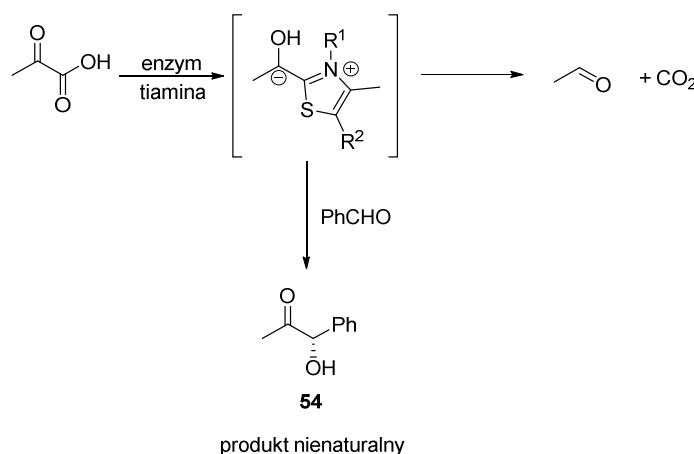
3.4. Promiskuityzm enzymatyczny

Podstawą klasyfikacji enzymów pod względem ich funkcji (liazy, hydrolazy) jest założenie, że dany rodzaj enzymów katalizuje jeden rodzaj reakcji – np. hydrolazy są enzymami katalizującymi hydrolizę, oksydazy katalizują reakcje utleniania etc. Rzeczywiście, enzymy w obrębie jednej rodziny wykazują znaczące podobieństwa w budowie centrum aktywnego (np. triada katalityczna w hydrolazach). Sugeruje to, że

⁶⁹ Znabet, A., Ruijter, E., Kanter de, F.J.J., Kohler, V., Helliwell, M., Turner, N. J., Orru, R.V.A, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 5289

⁷⁰ Kohler, V., Bailey, K.R., Znabet, A., Raftery, J., Manaleine, H., Turner, N.J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *122*, 228

wyewoluowały one w kierunku konkretnej aktywności w komórce.⁷¹ Okazuje się jednak, że wiele enzymów posiada zdolność katalizowania reakcji znacznie różnych od tych katalizowanych naturalnie.⁷²



Schemat 22. Przykład nienaturalnej reakcji dekarboksylazy pirogronianowej

Jednym z pierwszych przykładów takiego zjawiska, było odkrycie dodatkowej, nienaturalnej reakcji dekarboksylazy pirogronianowej, która naturalnie katalizuje reakcję dekarboksylowania pirogronianu do aldehydu octowego z wykorzystaniem tiaminy (Schemat 22). Okazało się jednak, że wykazuje ona również aktywność liazy, katalizując reakcję sprzęgania aldehydu octowego z aldehydem benzoesowym, co prowadzi do (*R*)-fenyloacetylokarbinolu (**54**).⁷³

W późniejszych latach wykazano, że wiele innych enzymów wykazuje podobną zdolność do katalizowania reakcji niebędących ich naturalnie katalizowanymi procesami.⁷⁴ Zaobserwowano również aktywność katalityczną dla niektórych białek strukturalnych lub przeciwciał, które nie są białkami katalitycznymi. Cechę tę, nazwano promiskuityzmem (rozwiązłością) enzymatycznym (ang.: *enzyme promiscuity*) i zdefiniowano jako: zdolność enzymu do katalizowania dodatkowej, wyraźnie różnej (od naturalnej) reakcji chemicznej.⁷⁵ Promiskuityzm enzymatyczny jest zjawiskiem interesującym nie tylko ze względu na mechanizm działania enzymów, ale również ma znaczenie praktyczne, ponieważ zwiększa możliwości ich zastosowania w syntezie organicznej.

⁷¹ Khersonsky, O., Roodveldt, C., Tawfik, D. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2006**, *10*, 498

⁷² Bornscheuer, U., T., Kazlauskas, R. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6032

⁷³ Bringer-Meyer, S., Sahm, H., *Biocatalysis* **1988**, *1*, 321

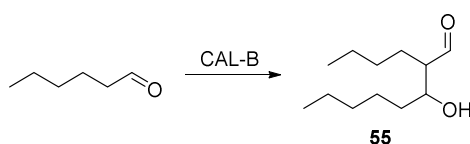
⁷⁴ a) Copley, S.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *7*, 265; b) Hult, K., Berglund, P., *Trends Biotechnol.*, **2007**, *25*, 231

⁷⁵ Taglieber, A. Hobenreich, H., Carballeira, J. D., Mondire, R. J. G., Reetz, M. T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 8597

3.4.1. Promiskuityzm lipaz

Lipazy są jednymi z najczęściej używanych enzymów w syntezie organicznej. Należą do grupy hydrolaz, a więc naturalnie katalizują one reakcję hydrolizy tłuszczów.⁵⁰ W bardzo wielu przykładach wykorzystywane są również do reakcji estryfikacji, transestryfikacji a nawet, jak wykazano w sekcji 3.2, reakcji amidowania amin oraz hydrolizy amidów. Warto zauważyć, że lipazy zdolne są do hydrolizy amidów pomimo, że jest to naturalna reakcja dla proteaz. Wynika to z faktu, że obie grupy enzymów należą do tej samej rodziny (w ujęciu ewolucyjnym) i posiadają w swoim centrum aktywnym konserwatywną w budowie tzw. triadę katalityczną. Triadę katalityczną stanowi zespół trzech aminokwasów: kwasowego (asparaginy), zasadowego (histydyna) oraz nukleofilowego (seryna, cysteina).⁵⁰ Reszty aminokwasów w triadzie katalitycznej jak również w innych fragmentach enzymu zawierają grupy funkcyjne o określonych właściwościach chemicznych, co może być odpowiedzialne za dodatkowe reakcje katalizowane przez lipazy.⁷⁶

Berglund opisał, jako pierwszy, przykład promiskuitywnej reakcji lipaz, w której enzym katalizował tworzenie wiązania węgiel-węgiel. W tej pracy, autorzy zaprezentowali kondensację aldolową heksanal, katalizowaną przez lipazę z *Candida antarctica*, prowadzącą do związku **55** (Schemat 23).⁷⁷



Schemat 23. Kondensacja aldolowa katalizowana przez lipazę

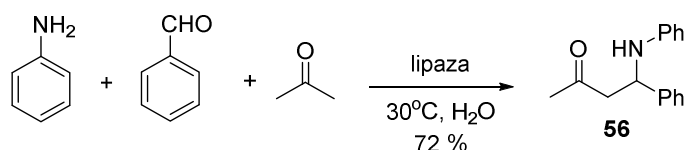
Autorom dodatkowo udało się zwiększyć szybkość reakcji poprzez zastosowanie enzymu, w którym zastąpiono aminokwas Ser105, alaniną. Taką mutację wykonano w oparciu o postulowany mechanizm reakcji, zakładający wykorzystanie tzw. "luki oksyanionowej" w enzymie, która stabilizuje w tym przypadku formę enolową aldehydu. Według autorów, obecność reszty seryny w obrębie tej luki prawdopodobnie powodowała spowolnienie reakcji poprzez tworzenie acetalu z heksanalem. W późniejszych badaniach autorzy wykorzystali tak zmodyfikowany enzym do przeprowadzenia reakcji addycji Michaela związków 1,3-karbonylowych (malonian dietylu, 1,3-pentadion) do akroleiny lub

⁷⁶ O'Brien, P. J., Herschlag, D., *Chem. Biol.*, **1999**,6, R91

⁷⁷ Branneby, C., Carlqvist, P., Magnusson, A., Hult, K., Brinck, T., Berglund, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 874

akrylanu metylu.⁷⁸ W przypadku tej reakcji, obliczenia kwantowo mechaniczne sugerowały, że luka oksyanionowa stabilizowała związek karbonylowy (akroleinę), natomiast reszta histydyny aktywowała związek dikarbonylowy.

Znane są również przykłady katalizowania przez lipazy reakcji multikomponentowych takich jak reakcja Hantcha⁷⁹ oraz Mannicha.⁸⁰ W reakcji aldehydu benzoowego, acetonu oraz aniliny, otrzymano produkt reakcji Mannicha **56** z wydajnością 3%. Gdy reakcja prowadzona była w obecności lipazy z *Mucor miehei*, wydajność reakcji wzrosła do 72% (Schemat 24).



Schemat 24. Reakcja Mannicha katalizowana przez lipazę z *Mucor miehei*

3.5. Podsumowanie rozdziału

W rozdziale przedstawiono wybrane przykłady zastosowania enzymów w syntezie organicznej. Wiele syntez z wykorzystaniem enzymów przebiega stereoselektywnie, co umożliwia otrzymanie optycznie czystych związków. Zaprezentowano wykorzystanie enzymów do rozdziału kinetycznego racemicznych amin pierwszorzędowych z wykorzystaniem lipaz i transaminaz. Przedstawiono szereg metod uzyskania optycznie czystych amin na drodze hydrolizy amidów, acylowania amin oraz utlenienia amin. Reakcje utlenienia amin katalizowane przez transaminazy są wysoce stereoselektywne jednak lipazy są łatwiej dostępne i nie wymagają kofaktorów, co ułatwia przeprowadzenie reakcji w skali preparatywnej.

Wykazano, że enzymy mogą być stosowane w kombinacji z reakcjami multikomponentowymi co znacznie rozszerza możliwości reakcji Ugięgo i umożliwia otrzymanie w tej reakcji związków nieracemicznych.

Przytoczono również wiele przykładów pokazujących, że pomimo swojej selektywności, enzymy mogą wykazywać tzw „promiskuityzm katalityczny”. Polega on na katalizowaniu dodatkowych, nienaturalnych reakcji przez dany enzym. Promiskuityzm enzymatyczny, wynikający z budowy chemicznej enzymu, pozwala na zastosowanie enzymów do zupełnie nowych i czasem nieprzewidywalnych reakcji. Dzięki temu

⁷⁸ Svedendahl, M., Hult, K., Berglund, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17988

⁷⁹ Wang, J.-L., Liu, B.-K., Yin, C., Lin, X.-F., *Tetrahedron* **2011**, *67*, 2689

⁸⁰ Li, K., He, T., Li, C., Feng, X. W., Wang, N., Yu, X. Q., *Green Chem.*, **2009**, *11*, 777

zjawisku, lipazy zwyczajowo służące do reakcji estrów i alkoholi mogą zostać zastosowane do katalizowania reakcji aldolowej, addycji Michaela a nawet niektórych reakcji multikomponentowych.

4. Układ tioredoksyna - reduktaza tioredoksyny jako cel terapeutyczny w leczeniu nowotworów

Zaangażowanie oddychania tlenowego do pozyskiwania energii, wymagało od komórki wykształcenia sposobu na eliminację niebezpiecznych produktów ubocznych, które towarzyszą temu procesowi. Produktami tymi są tzw. reaktywne formy tlenu (ROS, *ang. Reactive Oxygen Species*). Do reaktywnych form tlenu należą m.in.: anion nadtlenny (O_2^-), rodnik hydroksylowy ($OH\bullet$), tlen singletowy (1O_2) oraz nadtlenek wodoru (H_2O_2).⁸¹ Powstają one głównie w mitochondrium gdzie zachodzi łańcuch oddechowy oraz inne procesy związane z produkcją energii. Niektóre ROS przekształcane są przez dysmutazę nadtlenną w nadtlenek wodoru, który jako cząsteczka obojętna elektrycznie może dyfundować do wnętrza komórki.⁸² Dlatego też zwiększone stężenie ROS w mitochondrium ma bezpośredni wpływ na funkcjonowanie innych organelli w komórce.

Prawidłowo funkcjonująca komórka utrzymuje równowagę pomiędzy aktywnością metaboliczną, skutkującą produkcją ROS, a zdolnością do ich neutralizowania, utrzymując tym samym tzw. „równowagę redoks”.⁸³ W momencie, gdy komórka wykazuje zbyt intensywny metabolizm, systemy neutralizujące reaktywne formy tlenu mogą nie nadążać z ich neutralizacją. Komórka zaczyna wtedy zmagać się z tak zwanym „stresem oksydacyjnym”. Stres oksydacyjny może być spowodowany różnymi czynnikami. Należą do nich m. in.: promieniowanie UV, szok termiczny, promienie Röntgena, szok osmotyczny oraz zatrucie chemiczne. Zaburzenia równowagi redoks mogą powodować uszkodzenia DNA, białek błony komórkowej,⁸⁴ utlenianie reszt cysteiny (prowadzące do agregacji białek) oraz utlenianie reszt nienasyconych kwasów występujących w błonie komórkowej.^{85,86} W niektórych przypadkach, stężenie reaktywnych form tlenu pełni funkcję przekazywania sygnałów.⁸⁷ Niewielki poziom ROS może stymulować kinazy ERK (białka służące przekazywaniu sygnału w komórce poprzez fosforylację innych białek), które pobudzają podział komórek lub wpływają na czynniki stymulujące wzrost i podział komórki. Do czynników tych należą: EGF (*ang: epidermal growth factor*) lub PDGF (*ang. platelet-derived growth factor*) - odpowiedzialne za angiogenezę wzrost naczyń

⁸¹ Nordberg, J., Arner, E. S., *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, 31, 1287

⁸² Zhang, D. X., Gutterman, D. D., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2007**, 292, p. H2023

⁸³ Nguyen, P., Awwad, R.T. Smart, D.D. K., Spitz D.R., Gius D., *Cancer Lett.*, **2006**, 236, 164

⁸⁴ Rhee, S. G., Chae, H. Z., Kim, K., *Free Radic. Biol. Med.*, **2005**, 38, 1543

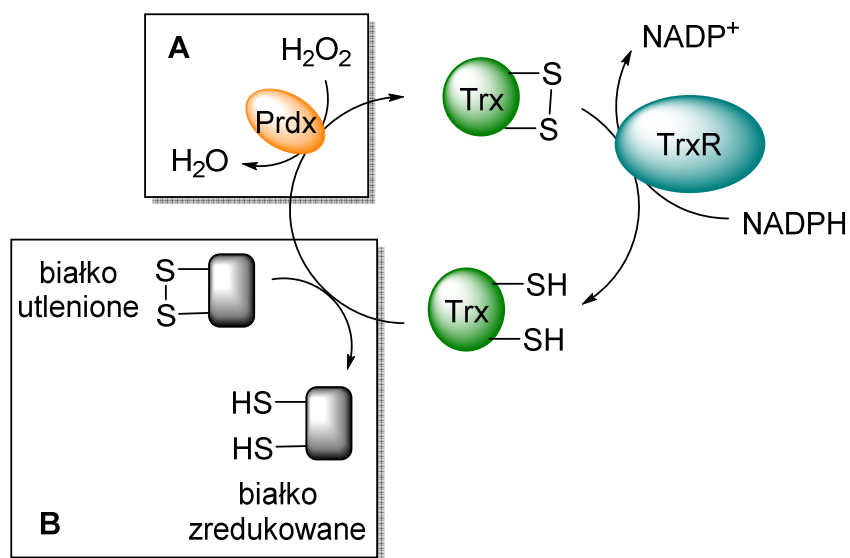
⁸⁵ Burcham, P. C., *Mutagenesis* **1998**, 13, 287

⁸⁶ Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2007**, 47, 143

⁸⁷ Fujino, G. Noguchi, T., Kohsuke T., Ichijo H., *Sem. Cancer Biol.*, **2006**, 16, 427

włosowatych między komórkami). W konsekwencji, małe stężenia reaktywnych form tlenu mogą pobudzać podział komórkowy. Zbyt wysoki stres oksydacyjny, jako efekt nieprawidłowego działania komórki, indukuje szlaki komórkowe prowadzące do jej zaprogramowanej śmierci - apoptozy.

Utrzymanie prawidłowego stężenia ROS jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania komórki i chroni ją przed działaniem czynników zewnętrznych. Wraz z pokarmem przyjmowane są tak zwane przeciwutleniacze (zawarte m. in. w kawie, zielonej herbacie), które pomagają neutralizować reaktywne formy tlenu i wolne rodniki. Jednak do pełnej ochrony komórka potrzebuje nie tylko substancji przyjmowanych z zewnątrz, ale endogennego systemu utrzymującego „równowagę redoks”. Dwoma najważniejszymi systemami służącymi temu celowi są: tioredoksyna (Trx) – reduktaza tioredoksyny (TrxR) oraz system oparty na reduktazie glutationowej.⁸⁸



Rycina 2. Zasada działania systemu tioredoksyny oraz główne funkcje w komórce: A) likwidacja reaktywnych form tlenu, B) redukcja uszkodzonych białek. Trx – tioredoksyna, TrxR – Reduktaza tioredoksyny, Prdx - peroksyredoksyna

Układ tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny (Trx-TrxR) składa się z dwóch elementów białkowych; większego białka reduktazy tioredoksyny i mniejszej tioredoksyny. Tioredoksyna redukuje dany substrat w komórce, przy czym sama zostaje utleniona. Utleniona Trx nie może dalej działać jako reduktor, dlatego w kolejnym etapie reduktaza tioredoksyny redukuje tioredoksynę z udziałem NADPH, dzięki czemu tioredoksyna odzyskuje swoją aktywność (Rycina 2).

⁸⁸ Tonissen K. F., Trapani D.G., *Mol. Nutr. Food. Res.*, **2009**, 53, 87

4.1. Reduktaza tioredoksyny

Reduktaza tioredoksyny jest enzymem o wielkości średniej 55 kDa występującym w formie aktywnej jako homodimer.⁸⁹ W komórkach ssaków rozróżniane są dwa typy TrxR: cytoplazmatyczna (TrxR1) oraz mitochondrialna (TrxR2). Reduktaza tioredoksyny posiada dwa miejsca aktywne, tzw. N-terminalne miejsce aktywne i C-terminalne miejsce aktywne. Pierwsze z nich zawiera dwie reszty cysteiny w pozycjach Cys59 i Cys64, natomiast miejsce C-terminalne zawiera cysteinę w pozycji Cys497 i selenocysteinę w pozycji Sec498. Fakt obecności selenu zamiast atomu siarki, tłumaczony jest mniejszym naprężeniem wiązań S-Se między sąsiadującymi resztami selenocysteiny i cysteiny w porównaniu do wiązania między dwiema cysteinami. Sugeruje to fakt, że niektóre bakteryjne reduktazy tioredoksyny, które nie posiadają selenocysteiny mają mniejszą aktywność.⁸⁹ Pomimo, że ludzka reduktaza tioredoksyny zdolna jest do redukcji niektórych małych cząsteczek, jej głównym substratem pozostaje tioredoksyna. W proces redukcji tioredoksyny zaangażowane są dwie cząsteczki TrxR, które tworzą dimer. Mechanizm redukcji tioredoksyny polega na kaskadowej redukcji mostków disiarczkowych w enzymie. W pierwszym etapie para Cys-Cys w N-terminalnym miejscu aktywnym jest redukowana przez NADPH. Następnie, redukowana jest druga, C-końcowa para Cys-Sec pochodząca z drugiego monomeru. Tak zredukowane miejsce aktywne wiąże utlenioną tioredoksynę i redukuje ją. Zredukowana tioredoksyna jest następnie uwalniana i może znów pełnić swoją rolę przeciwutleniającą.

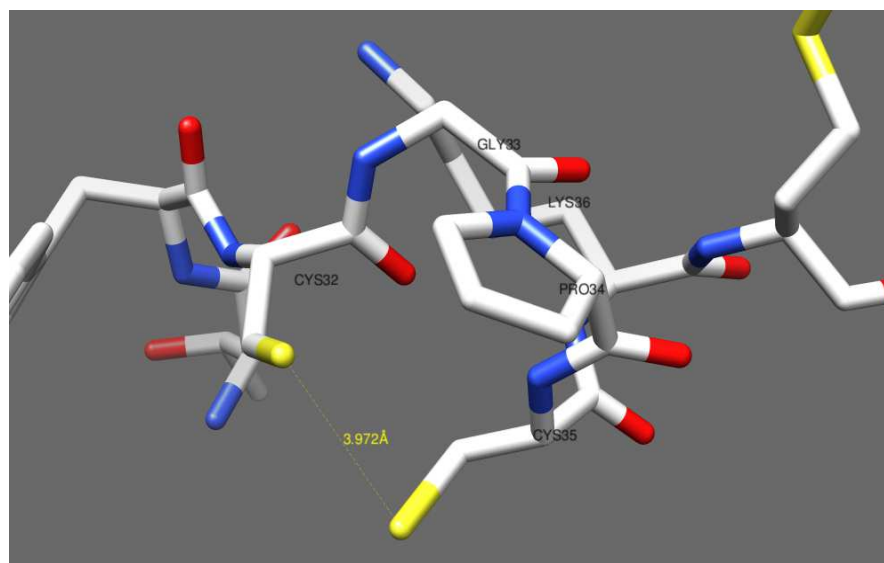
4.2. Tioredoksyna

Tioredoksyna jest mniejszym od reduktazy tioredoksyny białkiem o masie ok. 12 kDa. Jako miejsce aktywne posiada tzw. „motyw tioredoksyny”, który jest obecny w wielu innych białkach. Motyw ten zawiera sekwencję: (W)CGPC(K), przy czym aminokwasy umieszczone w nawiasach mogą się różnić w różnych typach tioredoksyny. Podobnie jak w przypadku TrxR podczas redukcji cząsteczek docelowych, obecne w miejscu aktywnym reszty cysteiny (Cys33 i Cys35) formują mostek disiarczkowy.

Analiza krystalograficzna ujawniła, że jedna z cystein jest wyeksponowana na zewnątrz enzymu, natomiast druga schowana do wewnątrz (Rycina 3). Trzecia cysteina (Cys73) służy formowaniu homodimeru, złożonego z dwóch cząsteczek tioredoksyny. Dopiero w takiej postaci tioredoksyna jest aktywna. Podobnie jak reduktaza tioredoksyny,

⁸⁹ Gromer S., Urig S., Becker K. *Med. Res. Rev.*, **2004**, 24, 1, 40

tioredoksyna może bezpośrednio redukować małe cząsteczki (Rycina 2A), ale jej podstawowymi substratami do redukcji są inne białka, które uległy uszkodzeniu na skutek utlenienia reszt cysteiny (Ryc. 2B). Poprzez redukcję mostków disiarczkowych w uszkodzonych białkach tioredoksyna przywraca ich aktywność i zapobiega ich agregacji. Na stężenie ROSów Trx wpływa również pośrednio, utrzymując w stanie zredukowanym białka z rodziny peroksyredoksyn, które regulują stężenie nadtlenu wodoru (Rycina 2A).⁹⁰



Rycina 3. Struktura miejsca aktywnego tioredoksyn

Wśród białek regulowanych przez tioredoksynę są również m.in. czynniki transkrypcji związane z reakcjami komórki na różnego rodzaju stres: p53 (supresor nowotworowy), HIF-1 (reakcja na niedobór tlenu), NF-kB (reakcja na bodźce stresowe) oraz AP-1 (reakcja na zakażenie).^{88,91,92} Trx uczestniczy również w syntezie deoksynukleotydów jako donator protonów dla reduktazy rybonukleotydów.⁹³ Tioredoksyna pełni ważną rolę w inhibicji szlaków proapoptycznych. Zredukowana forma Trx inhibuje, bowiem kinazę Ask1, która aktywuje szlaki prowadzące do apoptozy.⁹⁴ Ta obserwacja ma szczególne znaczenie w przypadku, kiedy proces apoptozy jest hamowany nawet, jeśli komórka działa nieprawidłowo. Ponieważ taka sytuacja ma miejsce w komórkach nowotworowych, tioredoksyna może być obiecującym celem terapeutycznym w leczeniu raka.

⁹⁰ Rhee, S. G., Chae, H. Z., Kim, K., *Free Radic. Biol.Med.*, **2005**, 38, 1543

⁹¹ Ueno, M., Masutani, H., Arai, R. J.; Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J., Nikaïdo, T., *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 35809

⁹² Powis, G.; Montfort, W. Annu, R.. *Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2001**, 41, 261

⁹³ Holmgren, A., *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 13963

⁹⁴ Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., *Science* **1997**, 275, 90

4.3. Układ tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny w leczeniu nowotworów

Jedną z pierwszych obserwacji sugerującą związek aktywności układu tioredoksyny z chorobą nowotworową był znacznie podwyższony poziom tioredoksyny w komórkach nowotworowych (w porównaniu z komórkami zdrowymi).⁹⁵ Okazuje się, że rola układu Trx-TrxR w chorobach nowotworowych jest przewrotna. Początkowo, układ zapewnia bowiem ochronę przed czynnikami mogącymi uszkadzać DNA i białka, więc jego działanie jest korzystne dla komórki zdrowej. Z drugiej jednak strony, jak wspomniano wcześniej, duży poziom tioredoksyny w komórce może powodować hamowanie apoptozy. Sprzyja to rozwojowi komórek działających nieprawidłowo. Gdy więc nowotwór zacznie się już rozwijać, układ Trx-TrxR zostaje jednym z jego głównych systemów obronnych. Dlatego komórki rakowe potrzebują znacznie wydajniejszej ekspresji tioredoksyny i reduktazy tioredoksyny niż komórki zdrowe. Ponieważ leczenie chorób nowotworowych polega m. in. na wywoływaniu w komórce różnego rodzaju stresu, tioredoksyna pomaga uodparniać się komórkom rakowym na chemioterapeutyki.⁹⁶

Drugi aspekt inhibicji układu Trx-TrxR związany jest z hamowaniem szlaków proapoptycznych przez tioredoksynę. Wewnętrzne szlaki apoptyczne mogą być aktywowane przez różnego rodzaju czynniki stresowe, jak np.: promieniowanie UV czy cytotoksyczne substancje. Jednym ze szlaków aktywowanych zewnątrzkomórkowo przez stres, jest szlak aktywowany czynnikiem TNF (ang. *Tumor Necrosis Factor*). TNF działa na odpowiednie receptory, uruchamiając proapoptyczne szlaki przez aktywację kaskady kinaz z rodziny MAPK (ang. *Mitogen Activated Protein Kinases*). Kaskada ta prowadzi ostatecznie do śmierci komórki, w przypadku gdy działa ona nieprawidłowo. Szlak ten rozpoczyna kinaza Ask1 (ang. *Apoptosis Signal-regulating kinase 1*), która jest inhibowana przez zredukowaną formę tioredoksyny. W prawidłowej komórce, jeśli stężenie ROS rośnie, spada stężenie zredukowanej tioredoksyny, co prowadzi do wzrostu aktywności Ask1 i szlak apoptyczny jest uruchamiany.⁸⁷ W komórkach rakowych, duże stężenie reduktazy tioredoksyny i tioredoksyny hamuje kinazę Ask1, co umożliwia ich dalsze funkcjonowanie pomimo stresu oksydacyjnego.

Podsumowując powyższe obserwacje, układ tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny może być zastosowany jako cel terapeutyczny w leczeniu nowotworów. Hamowanie tego

⁹⁵ Berggren, M., Gallegos, A., Gasdaska, J.R., Gasdaska, P.Y., Warneke, J., Powis, G., *Anticancer Res.*, **1996**, *16*, 3459

⁹⁶ Kim, S. J., Miyoshi, Y.; Taguchi, T.; Tamaki, Y., Nakamura, H.; Yodoi, J.; Kato, K.; Noguchi, S. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*, 8425

układu może wpływać na komórki nowotworowe bezpośrednio, na drodze indukcji apoptozy lub pośrednio, poprzez uwrażliwienie komórek nowotworowych na istniejące terapie.

4.3.1. Inhibitory układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny

Jak wcześniej wspomniano, zarówno tioredoksyna jak i reduktaza tioredoksyny działają na zasadzie wymiany mostków disiarczkowych pomiędzy dwiema resztami cystein (lub selenocysteiny) znajdujących się w centrach aktywnych obu enzymów (Rycina 2). Wiadomo również, że jedna z cystein centrum aktywnego tioredoksyny jest wyeksponowana na zewnątrz, co czyni ją bardziej nukleofilową. Z tych względów większość inhibitorów układu TrxR-Trx działa poprzez oddziaływanie z resztami cysteiny w enzymie. Oddziaływania te polegają na kompleksowaniu siarki atomami metalu lub na kowalencyjnym tioalkilowaniu czynnikami elektrofilowymi.

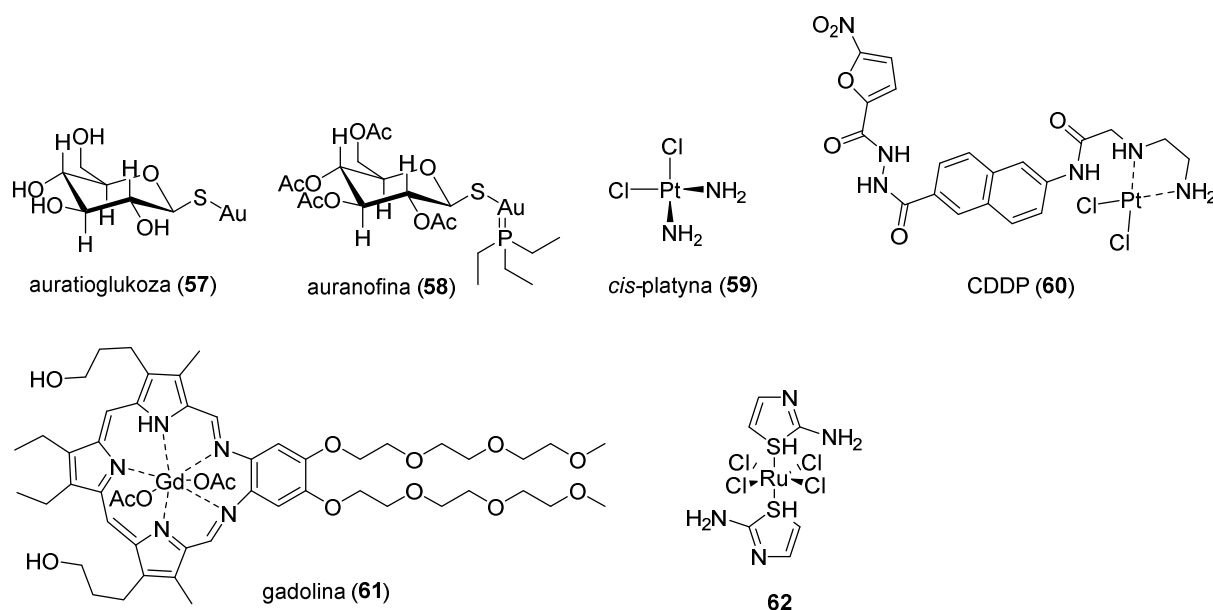
4.3.1.1. Związki zawierające atom metalu

Wiadomo, że reszty tiolowe tworzą trwałe kompleksy z wieloma metalami. Dlatego wiele spośród związków zawierających atom metalu może trwale inaktywować enzym zawierający resztę cysteiny w centrum aktywnym. Przykładem jest cisplatyna (**59**) oraz CDDP (**60**), które od dawna stosowane są w chemioterapii (Schemat 25). Uważa się, że cisplatyna działa poprzez bezpośrednie uszkodzenie łańcucha DNA w komórkach rakowych tworząc z nim trwałe addukty. Okazuje się jednak, że związki platyny są również efektywnymi inhibitorami reduktazy tioredoksyny. Na tyle silnymi, że mogą działać na enzym nawet w stechiometrycznych ilościach.⁹⁷ IC₅₀ tych związków wynoszą ok 2 nM, co czyni z nich bardzo efektywne inhibitory reduktazy tioredoksyny. Co więcej oba związki wykazują selektywność wobec reduktazy tioredoksyny, nie hamują zaś reduktazy glutationu, która również zawiera cysteinę w centrum aktywnym.

Związki zawierające atom złota były początkowo stosowane na schorzenia reumatoidalne, jednak z uwagi na ich silne działanie cytotoksyczne na komórki rakowe, związki złota (I) i złota (III) są stosowane w terapii przeciwnowotworowej. Ich mechanizm nie jest do końca potwierdzony. Ponieważ jednak złoto wykazuje silne powinowactwo do siarki tioredoksyna może być jednym z celów tego związku w komórce. Potwierdzono, że związki zawierające atom złota w swojej strukturze – auratioglukoza (**57**) oraz auranofina

⁹⁷ Sasada, T., Nakamura, H., Ueda, S., Sato, N., Kitaoka, Y., Gon, Y., Takabayashi, A., Spyrou, G., Holmgren, A., Yodoi J., *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, 27, 504

(58) rzeczywiście wykazują silne działanie hamujące na reduktazę tioredoksyne na poziomie stężeń nanomolowych (Schemat 25).⁹⁸ Podobnie jak cisplatyna, auranofina jest również selektywna wobec reduktazy tioredoksyne jednak nadal reduktaza glutationu hamowana jest na poziomie mikromolowym. Reduktaza glutationowa nie posiada C-terminalnego miejsca aktywnego z selenocysteiną. Można, więc przypuszczać, że to właśnie centrum z selenocysteiną jest celem działania auranofiny. Badano również cytotoksyczność auranofiny względem komórek nowotworowych, które wykształciły oporność na cisplatynę. Zaobserwowano dużą cytotoksyczność tego związku wobec tych komórek, co może potwierdzać ochronny efekt układu Trx-TrxR.⁹⁹



Schemat 25. Znane inhibitory tioredoksyne oddziałujące z grupami tiolowymi

Kompleksy rutenu również wykazywały aktywność hamującą reduktazę tioredoksyne, jednak są mniej efektywne od związków platyny i złota. Związek 62, wykazuje jednak selektywność względem cytoplazmatycznej reduktazy tioredoksyne i jest mniej aktywny wobec mitochondrialnej TrxR. Podstawa tej selektywności nie była jednak wyjaśniona.¹⁰⁰

Wiele innych związków zawierających atom metalu posiada potwierdzoną aktywność względem układu tioredoksyne-reduktaza tioredoksyne w tym stosowany w

⁹⁸ Gromer, S., Arscott, L.D., Williams, Jr, C.H., Schirmer, R.H., Becker, K., *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 20096

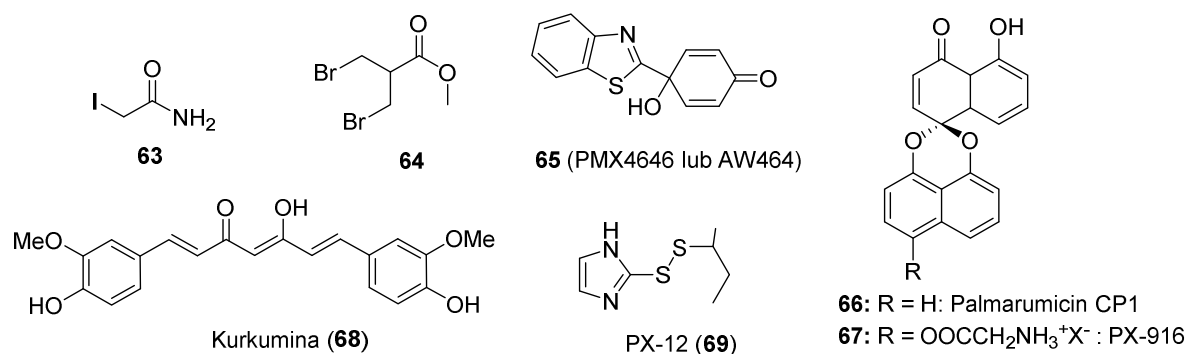
⁹⁹ Marzano, C., Gandin, V., Folda, A., Scutari, G., *Free Radic. Biol. Med.*, **2007**, 42, 872

¹⁰⁰ Mura, P., Camalli, M., Bindoli, A., Aorrentino, F., Casini, A., Gabbiani, C., Corsini, M., Zanello, P., Rigobello M.P., Messori, P., *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 5871

terapii związek **61**, zawierający w swojej strukturze atom gadolinu.¹⁰¹ Istotnym problemem w stosowaniu jednak związków zawierających atom metalu jest wysoka toksyczność tego rodzaju inhibitorów.

4.3.1.2. Związki alkilujące

Drugi mechanizm, z jakim związki chemiczne mogą działać na układ tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny, wynika z budowy centrum aktywnego i reaktywności zawartych w nim reszt cysteiny. Jako grupy nukleofilowe, mogą one wstępować w reakcje ze związkami elektrofilowymi. W rzeczywistości nawet proste czynniki alkilujące takie jak jodoacetamid¹⁰² (**63**) oraz 3-bromo-2-bromometylopropionian metylu¹⁰³ (**64**) wykazują silną aktywność hamującą Trx-TrxR. Jodoacetamid jest związkiem szeroko stosowanym przy sekwencjonowaniu peptydów, jako związek alkilujący. Stosuje się go również często w biologii molekularnej, jako nieselektywnego inhibitora enzymów zawierających cysteinę w centrum aktywnym,¹⁰⁴ dlatego jego zastosowanie terapeutyczne jest ograniczone.



Schemat 26. Znane inhibitory układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny z fragmentem elektrofilowym

Opracowano szereg bardziej złożonych, elektrofilowych inhibitorów systemu tioredoksyny oraz odkryto, że wiele związków pochodzenia naturalnego wykazuje silną aktywność wobec układu tioredoksyny. Przykładem związku pochodzenia naturalnego jest kurkumina (**68**), obecna w przyprawie, która działa korzystnie na organizm człowieka i wykazuje działanie przeciwnowotworowe.¹⁰⁵ Ten antyutleniacz w kulturach azjatyckich był stosowany na szeroki wachlarz dolegliwości począwszy od anoreksji, przez kaszel, choroby wątroby po zapalenie zatok. W swojej strukturze kurkumina posiada aktywowane

¹⁰¹ Cai, W., Zhang, L., Song, Y., Wang, B., Zhang, B., Cui, X., Hu, G., Liu, Y., Wu, J., Fang, J., *Free Radic. Biol. Med.*, **2012**, *52*, 257

¹⁰² Sun, Q., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K.T., Lee, B. J., Hetfield, L.D., Gladyshev, N.V., *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 24522

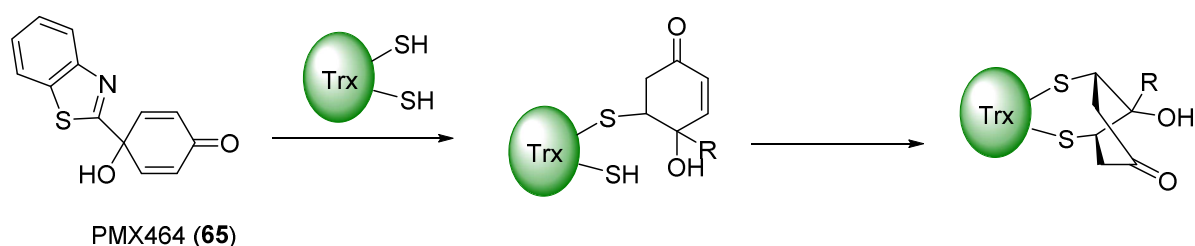
¹⁰³ PCT Int. Appl. WO 200006088 A2 20000210, 2000

¹⁰⁴ Gomi, T., Fujioka, M., *Biochemistry* **1982**, *21*, 4171

¹⁰⁵ Calabrese, V., Bates, B.E., Mancuso, C., Cornelius, C., Ventimiglia, B., Cambria, M.T., Di Renzo, L., De Lorenzo, A., Dinkova-Kostova D., *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, *52*, 1062

wiązanie podwójne sprzężone z grupami karbonyłowymi. Takie wiązania znane są ze swojej elektrofilowości i podatne są na addycję Michaela. Sądzi się, że kurkumina alkiluje dwie reszty cysteiny i selenocysteiny w reduktazie tioredoksyny właśnie poprzez reakcję Michaela.¹⁰⁶ Kurkumina nie jest jednak selektywnym inhibitorem układu Trx-TrxR gdyż działa na wiele innych enzymów takich jak: kinazy, cykliny oraz cykooksygenazy.¹⁰⁵

Innymi inhibitorami Trx-TrxR zawierającymi aktywowane wiązanie podwójne (sprzężone z grupą karbonylową) są PMX464¹⁰⁷ (**65**), Palmarumycyna CP1 (**66**) i inne naftochinony (np. związek **67**).¹⁰⁸ Proponowany mechanizm działania związku PMX464 na tioredoksynę opiera się na podwójnej addycji Michaela do jednej cząsteczki inhibitora i utworzeniu makrocyklicznego adduktu w miejscu aktywnym enzymu (Schemat 27).¹⁰⁹



Schemat 27. Proponowany mechanizm działania związku **65**

Mechanizm inhibicji polegający na reakcji Michaela reszt tiolowych potwierdzają badania zależności aktywności od struktury analogów spirochinonów **66**. Synteza wielu analogów związku **66** i ich badania biologiczne wykazały, że obecność wiązania podwójnego jest niezbędna dla inhibicji układu tioredoksyny – reduktazy tioredoksyny.¹¹⁰

Opisano również związek, który selektywnie hamuje aktywność tioredoksyny. Disulfid 1-metylopropylo-2-imidazylowy, PX-12, (**69**) obecnie znajduje się w II fazie badań klinicznych w leczeniu zaawansowanego raka trzustki.¹¹¹ PX-12 może odwracalnie tworzyć disiarczki w miejscu aktywnym zarówno TrxR jak i Trx, co prowadzi do ich utlenienia. Tak utlenione enzymy, mogą być jednak zregenerowane. Za inhibicję enzymu odpowiedzialne jest dopiero wiązanie z Cys73. Po pierwsze, blokuje to powstawanie aktywnego dimeru Trx, po drugie zaś tioredoksyna związana w tej pozycji nie będzie już

¹⁰⁶ Fang, J., Lu, J., Holmgren, A., *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 25284

¹⁰⁷ Bradshaw, T. D., Matthews, C. S., Cookson, J., Chew, E. H., Shah, M., Bailey, K., Monks, A., Harris, E., Westwell, A. D., Wells, G., Laughton, C. A., Stevens, M. F., *Cancer Res.*, **2005**, 65, 3911

¹⁰⁸ Powis, G., Wipf, P., Lynch, S. M., Birmingham, A., Kirkpatrick, D. L. *Mol. Cancer Ther.*, **2006**, 5, 630

¹⁰⁹ Pallis, M.; Bradshaw, T. D.; Westwell, A. D.; Grundy, M. Stevens, M. F.; Russell, N. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, 66, 1695

¹¹⁰ Wipf, P., Lynch, S. M., Birmingham, A., Tamayo, G., Jimenez, A., Campos, N., Powis, G., *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1651

¹¹¹ Kirkpatrick, D. L., Kuperus, M., Dowdeswell, M., Potier, N. Donald, L. J., Kunkel, M., Berggren, M., Angulo, M., Powis, G. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 55, 987

substratem dla reduktazy tioredoksyny, a więc nie może być zregenerowana. Dodatkowym działaniem PX-12, obserwowanym *in vivo* jest hamowanie wytwarzania VEGF (ang. Vascular Endothelial Growth Factor, czynnik wzrostu nabłonka śródnaczyniowego). Wykazano, że podwyższona produkcja VEGF towarzyszy nadekspresji tioredoksyny i przyspiesza wzrost naczyń krwionośnych wewnątrz guza. Jeżeli stężenie VEGF maleje, hamowany jest wzrost naczyń włosowatych w obrębie nowotworu, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania rozwoju guza.

Pomimo dobrych wyników *in vitro*, badania kliniczne wykazały szereg wad tego związku. Wykazuje on słabe działanie przeciwnowotworowe u ludzi (badania u pacjentów z rakiem trzustki), a jego metabolit – 2-merkaptobutan powoduje wiele efektów ubocznych. Dodatkowo, związek ten sprawia, że leczeniu towarzyszy bardzo nieprzyjemny i intensywny zapach (w salach, gdzie podawano PX-12 konieczne było stosowanie podciśnienia, aby zapach tiolu nie wydostawał się na zewnątrz).

4.4. Podsumowanie rozdziału

Układ tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny jest obiecującym celem terapeutycznym w leczeniu chorób nowotworowych. Wynika to z wpływu tego układu na procesy stabilizujące środowisko wewnątrz komórek nowotworowych oraz hamowanie szlaków aktywujących zaprogramowaną śmierć komórki – apoptozę. Jak wynika z powyższych opisów znanych inhibitorów układu Trx-TrxR, większość z nich oddziałuje bezpośrednio z resztami tiolowymi lub selenolowymi w obu enzymach. Wśród opisanych inhibitorów zawierających atom metalu można przypuszczać, że oddziaływanie z enzymem mają charakter bardzo silnych wiązań kowalencyjnych lub trwałych kompleksów z resztami cysteiny. Wciąż jednak mechanizmy działania wielu z nich nie są do końca wyjaśnione. Pomimo bardzo wysokiej aktywności niektórych związków (np. cisplatyna, auranofina) problemem pozostaje ich toksyczność i fakt, że tioredoksyna jest jednym z wielu miejsc działania tych związków. Cechą wspólną dla inhibitorów opisanych w rozdziale 4.3.2.1., jest obecność elektrofilowego fragmentu, który może alkilować nukleofilowe reszty cysteiny w enzymie. Inhibitory te są jednak cząsteczkami relatywnie mało stabilnymi, dlatego niektóre z nich mogą wykazywać się słabą selektywnością wobec innych reszt cysteiny w innych enzymach. Jedynie w przypadku PX-12, wykonano badania, które sugerują, że efekt cytotoksyczny jest spowodowany przez inhibicję Trx-

TrxR. W przypadku tego związku jednak badania kliniczne wykazały jego niską skuteczność w leczeniu nowotworów.

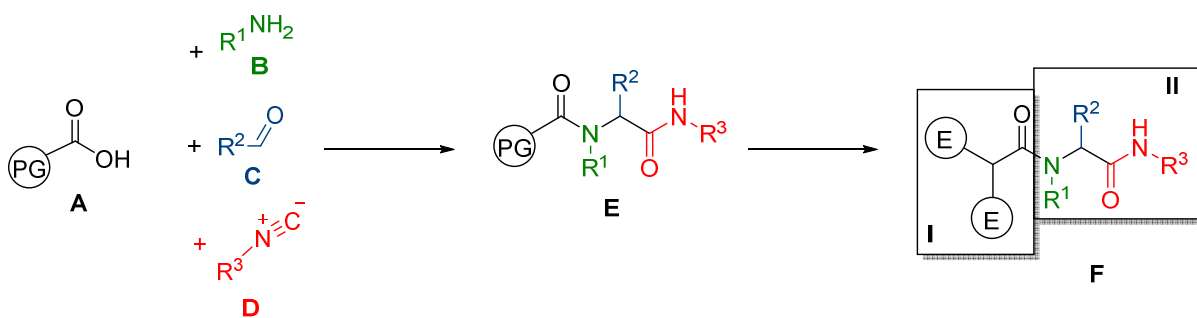
5. Badania własne

5.1. Koncepcja i cel badań

Celem wykonywanych badań było znalezienie nowego inhibitora układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny o strukturze peptydomimetyku.

Przedstawione w części teoretycznej dane literaturowe wskazują, że nie są znane inhibitory układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny o strukturze peptydomimetyku. Ze względu na fakt, iż jest to układ odpowiedzialny m. in. za redukcję białek, uzasadnionym jest poszukiwanie inhibitorów tego układu wśród analogów peptydów. Projektowane związki powinny jednocześnie posiadać odpowiedni fragment elektrofilowy, który jest wspólną cechą większości inhibitorów układu tioredoksyny przedstawionych w rozdziale 4.3.1.2. Związane to będzie niewątpliwie z mechanizmem działania znanych inhibitorów, polegającym na kowalencyjnym wiązaniu reszt cysteiny zlokalizowanych w centrum aktywnym enzymu. Związki takie powinny posiadać w swojej strukturze aktywowane wiązanie podwójne lub atom halogenu jak w inhibitorach **63-68**, co jest niezbędne dla uzyskania aktywności wobec układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny.

Koniecznym jest opracowanie metod syntezy umożliwiających otrzymanie peptydomimetyków o zróżnicowanej budowie i z różnymi fragmentami elektrofilowymi. Uzyskanie szerokiej biblioteki związków umożliwi przeprowadzenie badań zależności pomiędzy aktywnością biologiczną a strukturą (ang: *structure-activity relationship*, SAR). Badania takie, z kolei mogą umożliwić, optymalizację poszczególnych fragmentów docelowych związków prowadzącą do podwyższenia ich aktywności biologicznej.



Schemat 28. Strategia syntezy nowych inhibitorów układu tioredoksyny. PG – prekursor grupy elektrofilowej, E – grupa elektrofilowa

W przedłożonej pracy zaproponowano wykorzystanie reakcji Ugięgo gdyż, jak wykazano w części literaturowej, jest to niezwykle wygodne narzędzie do syntezy peptydomimetyków. Proponowana strategia syntezy zakłada wykorzystanie kwasu

karboksylowego **A**, jako prekursora fragmentu elektrofilowego, aminy **B**, aldehydu **C** i izocyjanku **D**, z których otrzymywane będą związki o budowie ogólnej **E**. Ich następcza funkcjonalizacja prowadzi będzie do peptydomimetyków **F**, zawierające fragment elektrofilowy **I** oraz fragment **II**, o budowie analogicznej do peptydów (Schemat 28).

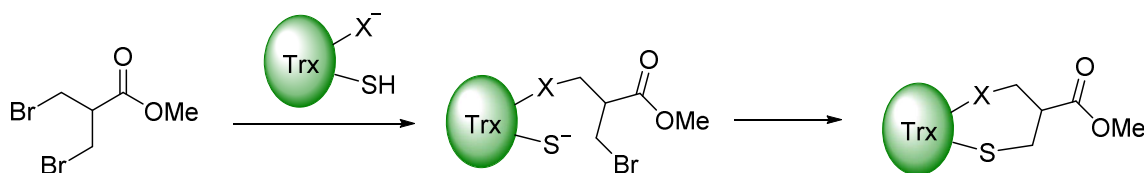
Dodatkowo, biorąc pod uwagę złożoność oddziaływań inhibitora z enzymem, niezbędne jest opracowanie stereoselektywnej metody syntezy takich inhibitorów tak, aby można było uzyskać pełne dane dotyczące wpływu budowy przestrzennej tych związków na aktywność biologiczną. Wymagać to będzie zastosowania odpowiednich pomocników chiralnych do syntezy peptydomimetyków o strukturze **E**. Dotychczas, nie opisano optycznie czynnej aminy, która mogłaby być zastosowana jako pomocnik chiralny do syntezy związków **E**. Z tego też powodu, przeprowadzone zostaną badania nad wykorzystaniem enzymów do syntezy chiralnej, nieracemicznej 1-(2,4-dimetoksybenzylo)etyloaminy. Związek ten będzie stosowany jako nowy pomocnik chiralny w reakcji Ugięgo prowadzącej do enancjomerycznie czystych peptydomimetyków **E**.

Ponieważ zastosowanie katalizy enzymatycznej stanowi bardzo atrakcyjną metodę nowoczesnej syntezy organicznej, przeprowadzone zostaną również badania nad możliwością opracowania nowego wariantu reakcji Ugięgo, z wykorzystaniem biokatalizatorów.

Prezentowane w tej części związki pogrupowano na sekcje, w których numerację rozpoczęto od pełnej liczby, wielokrotności stu (100, 200 etc).

5.2. Badania nad syntezą peptydomimetyków z fragmentami elektrofilowymi

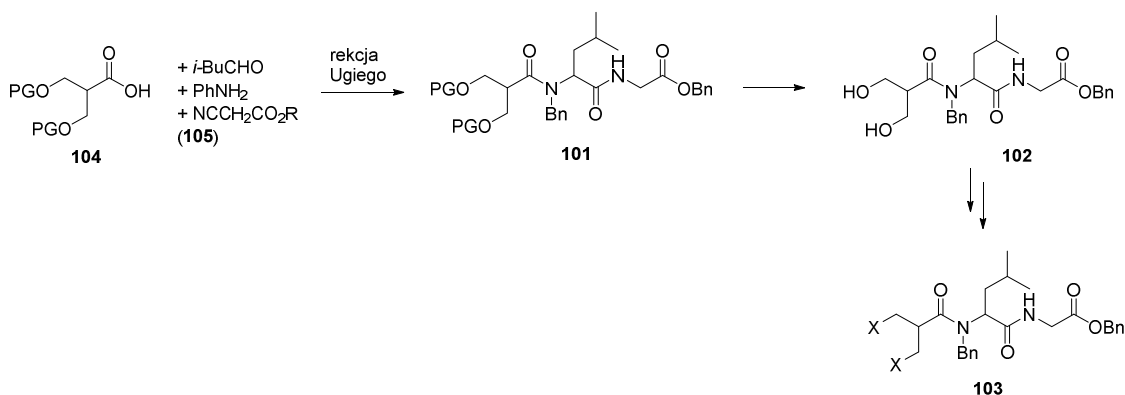
Celem tego etapu badań było opracowanie metody syntezy peptydomimetyków z różnymi bifunkcyjnymi fragmentami elektrofilowymi, bazując na strukturze związku **64**, zawierającym grupę dibromometylową. Mechanizm działania związku **64** nie był przedmiotem badań. Najprawdopodobniej działa on zgodnie z mechanizmem analogicznym do mechanizmu zaproponowanego dla związku PMX464, polegającym na podwójnej reakcji tioalkilowania dwóch reszt cysteiny Cys33 i Cys35, które są kluczowe dla aktywności tioreosksyny (Schemat 29).¹⁰⁹ Biorąc pod uwagę mechanizm przedstawiony na Schemacie 29, zaproponowano syntezę peptydomimetyków zawierających fragment dibromometylowy oraz jego analogów.



Schemat 29. Postulowany mechanizm alkirowania reszt cysteiny przez związek **64** w tioreosksynie (X=S) lub w reduktazie tioredoksyny (X=Se)

5.2.1. Badania nad opracowaniem syntezy peptydomimetyków, zawierających grupę dibromometylową oraz ich analogów

Zaproponowana strategia syntezy zakłada przeprowadzenie reakcji Ugięgo z odpowiednim kwasem, będącym prekursorem docelowych fragmentów elektrofilowych. Zaproponowano wykorzystanie kwasu karboksylowego **104**, który posiada dwie zabezpieczone grupy hydroksylowe.



Schemat 30. Strategia syntezy peptydomimetyków z fragmentem **64**

W pierwszym etapie syntezy, oprócz kwasu **104**, w reakcji Ugięgo użyte będą: aldehyd izowalerianowy, benzyloamina oraz izocyjanooctan benzylu. Zastosowanie

aldehydu izowalerianowego prowadzi do otrzymania peptydomimetyku **101**, zawierającego łańcuch boczny leucyny (Schemat 30). Wybór tego aldehydu podyktowany był faktem, iż reszta leucyny obecna jest w szeregu peptydomimetyków o działaniu przeciwnowotworowym.^{112,36} Pozostałe substraty – benzyloamina oraz izocyjanooctan benzylu zostały zaproponowane, ponieważ grupy benzytowe mogą być usunięte ze struktury produktu, co stwarza dodatkowe możliwości funkcjonalizacji produktów.

W kolejnym etapie badań, opracowane zostaną warunki, które umożliwią odbezpieczenie grup hydroksylowych w związku **101**, w celu uzyskania diolu **102**. Peptydomimetyk **102** będzie w kolejnych etapach transformowany do związków **103**, zawierających różne grupy opuszczające (X = Br, I, OTs, OMs).

5.2.1.1. Synteza substratów do reakcji Ugięgo

W celu przeprowadzania zaproponowanej syntezy, konieczne było otrzymanie kwasu karboksylowego **104** oraz izocyjanooctanu benzylu (Schemat 31, **105a**). Opisanych zostało wiele metod syntezy izocyjanoków.⁷ Wśród nich występują metody wykorzystujące jako substraty: halogenki alkilowe,¹¹³ aminy (synteza z wykorzystaniem karbenów),¹¹⁴ alkohole¹¹⁵ lub izocyjaniany.¹¹⁶ Najpopularniejszymi i jednocześnie najbardziej uniwersalnymi metodami syntezy izocyjanoków są te, w których zachodzi odwodnienie formamidów, otrzymanych z odpowiednich amin. Jako czynniki odwadniające stosowane są najczęściej chlorek oksalilu¹¹⁷, fosgen (również mniej niebezpieczne w użyciu: difosgen i trifosgen)¹¹⁸ oraz tlenochlorek fosforu.¹¹⁹

Stosując jako substrat ester glicyny (benzylowy lub etylowy) otrzymano formamidy **106a** i **106b**. Reakcje odwodnienia przeprowadzono stosując tlenochlorek fosforu, w obecności nadmiaru zasady (DIPEA) w temperaturze 0 °C. W reakcji tej otrzymano izocyjanooctan benzylu z wydajnością 83% oraz izocyjanooctan etylu z wydajnością 65% (Schemat 31).

¹¹² Shah, J.J., Orłowski, R. Z., *Leukemia* **2009**, 23, 1964

¹¹³ Engemyr, L.B.; Martinsen, A.; Songstad J. *Acta Chem. Scand. Ser. A*, **1974**, 28, 255

¹¹⁴ a) Hofmann, A.W. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1867**, 144, 114; b) Gokel, G.W.; Widera, R.P., Weber, W.P. *Org. Synth.*, **1976**, 55, 96

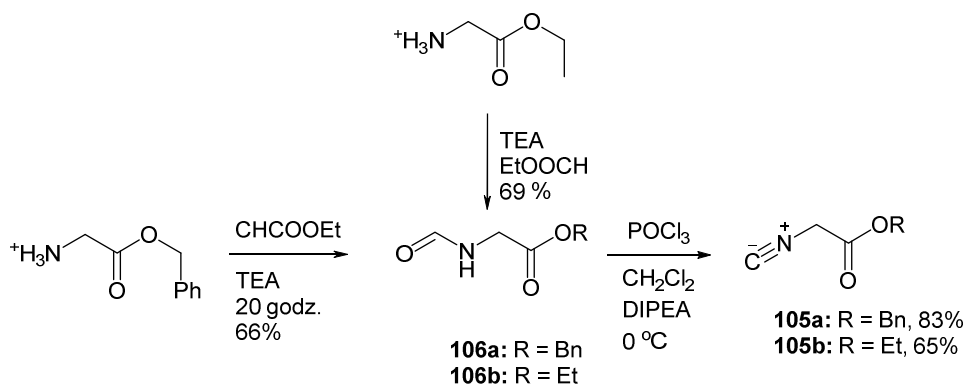
¹¹⁵ Kitano, Y.; Chiba, K.; Tada, M. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 1911

¹¹⁶ Hofmann, A.W. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1870**, 3, 766

¹¹⁷ Ugi, I.; Meyr, R. *Chem. Ber.*, **1960**, 93, 239

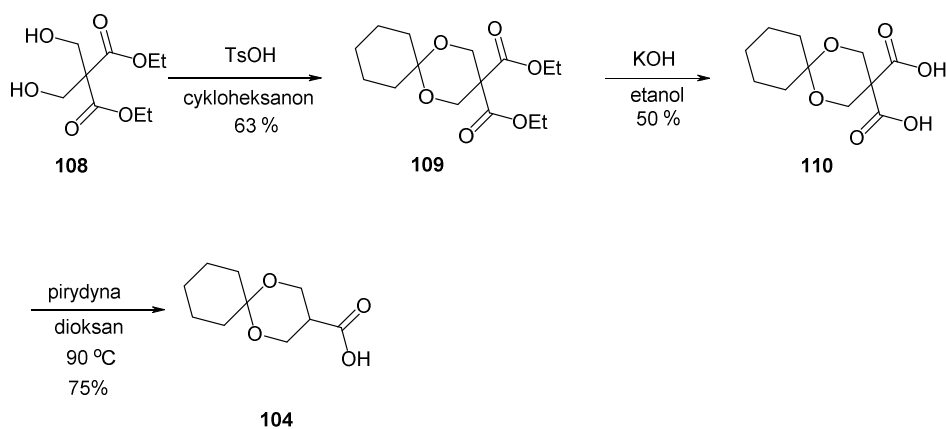
¹¹⁸ a) Barton, D.H.R.; Bowles, T.; Husinec, S.; Forbes, J.E.; Llobera, A.; Porter, A.E.A.; Zard, S.Z. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 3343 (fosgen); b) Skorna, G.; Ugi, I. *Angew. Chem.*, **1977**, 89, 267 (difosgen); c) Eckert, H.; Forster, B.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1987**, 26, 894, (trifosgen)

¹¹⁹ Leusen van, A.M.; Boerma, G.J.M.; Helmholdt, R.B.; Siderius, H.; Strating, J. *Tetraheron Lett.*, **1972**, 13, 2367



Schemat 31. Synteza izocyanków z wykorzystaniem tlenochlorku fosforu

Kwas karboksylowy do reakcji Ugiego (**104**) został otrzymany w wyniku trzyetapowej syntezy. W pierwszym etapie przeprowadzono reakcję *bis*-(hydroksymetylo)malonianu dietylu (**108**) z cykloheksanonem w obecności kwasu 4-toluenosulfonowego, otrzymując związek **109** z wydajnością 63%. Następnie przeprowadzono reakcję hydrolizy grup estrowych, otrzymując kwas dikarboksylowy **110** z wydajnością 50%. W kolejnym etapie kwas ten poddano reakcji dekarboksylowania ogrzewając go z pirydyną w dioksanie, co prowadziło do uzyskania oczekiwanego związku **104** z wydajnością 75%.

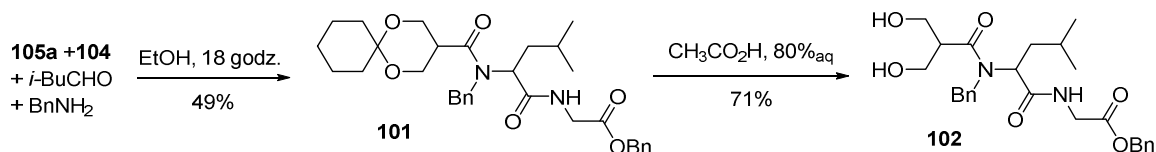


Schemat 32. Synteza kwasu karboksylowego **104**

5.2.1.2. Badania nad otrzymaniem peptydomimetyków w reakcji Ugiego

Otrzymany kwas **104** oraz izocyjanooctan benzylu zostały wykorzystane jako substraty w reakcji Ugiego z benzyloaminą i aldehydem izowalerianowym. W wyniku reakcji przeprowadzonej w temperaturze pokojowej, w etanolu otrzymano peptydomimetyk **101** z wydajnością 49%. W kolejnym etapie przeprowadzono reakcję odbezpieczania grup hydroksylowych, w celu otrzymania diolu **102**. Stosując reakcję z

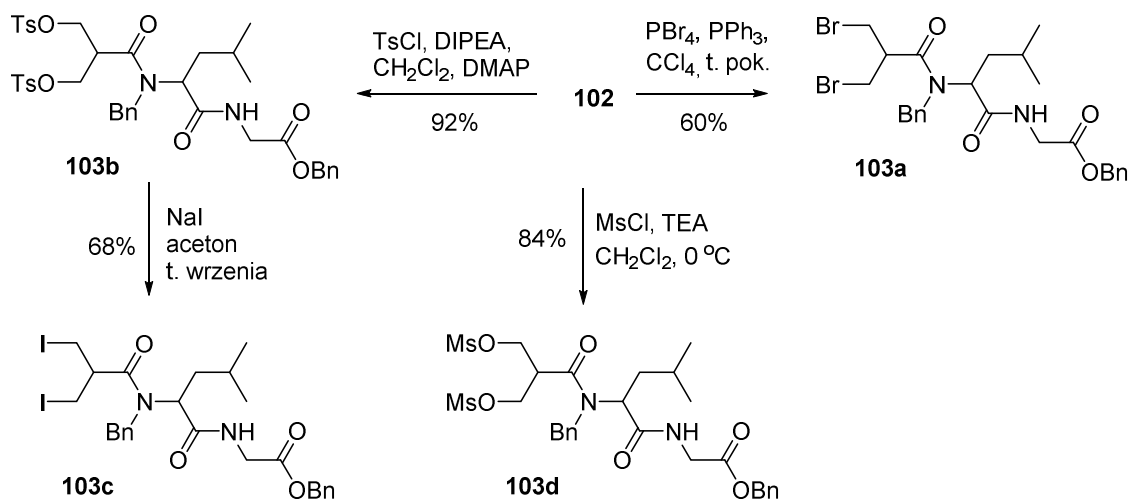
80% wodnym roztworem kwasu octowego otrzymano diol **102** z wydajnością 71% (Schemat 33).



Schemat 33. Synteza 1,3-diolu z wykorzystaniem reakcji Ugiego z kwasem **104**

Związek **102** zastosowano jako prekursor do syntezy peptydomimetyków zawierających grupy opuszczające w pozycji 1,3 względem siebie, analogicznie do struktury związku **64**. Peptydomimetyk **103a**, zawierający atomy bromu (X = Br) otrzymano w reakcji Appela z bromkiem fosforu oraz trifenylfosfiną, z wydajnością 60% (Schemat 34).

W kolejnym etapie przeprowadzono badania nad syntezą analogów związku **103a**. W tym celu, podjęto próby przekształcenia grup hydroksylowych w estry kwasu 4-toluenosulfonowego (TsO) oraz metanosulfonowego (MsO). Reakcja z chlorkiem mesyłu (MsCl), przeprowadzona została w obecności trietyloaminy (TEA), w chlorku metylenu. Diester mesyłowaty **103d** (X = OMs) otrzymano z wydajnością 84%.



Schemat 34. Synteza peptydomimetyków, analogów **64**, z wykorzystaniem diolu **102**.

Reakcja związku **102** z chlorkiem tosyłu, w analogicznych warunkach, nie prowadziła do otrzymania oczekiwanego produktu. W przypadku tej reakcji, konieczne było zastosowanie diizopropylaminy (DIPEA) z dodatkiem 10%_{mol} dimetyloaminopirydyny (DMAP), co umożliwiło uzyskanie związku **103b** (X = OTs) z wydajnością 63%. Wydajność reakcji wzrosła do 92% gdy zastosowano równomolową (względem **102**) ilość DMAP. Związek **103b** wykorzystano do syntezy peptydomimetyku

z grupami diiodometylowymi. W wyniku reakcji substytucji grup tosylowych jonami jodkowymi, otrzymano związek **103c** z wydajnością 68%.

5.2.2. Wyniki badań aktywności biologicznej uzyskanych związków względem układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny

Po zakończeniu syntezy chemicznej zostały wykonane badania nad określeniem aktywności biologicznej otrzymanych związków **103** na rekombinowanych enzymach Trx-TrxR zgodnie z opisaną procedurą eksperymentalną.¹²⁰ Wszystkie badania biologiczne prezentowane w niniejszej pracy były opracowane i wykonane przez dr Angelikę Muchowicz, w zespole Prof. Jakuba Gołęba w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

Tabela 1. Aktywność biologiczna peptydomimetyków z fragmentem dibromometylowym i jego analogów.

L.p.	Związek	IC ₅₀ [μM] ^c	LD ₅₀ [μM]	LD ₅₀ [μM]
			EMT6 ^a	Panc02 ^b
1	PX-12	12.3 ± 0.6	11.6	3.9
2	64	1.2 ± 0,8	>50	>50
3	103a	>50	n/o ^d	n/o
4	103b	>50	n/o	n/o
5	103c	>50	n/o	n/o
6	103d	>50	n/o	n/o
7	114	>50	n/o	n/o
8	111	0.44 ± 0.02	>50	>50

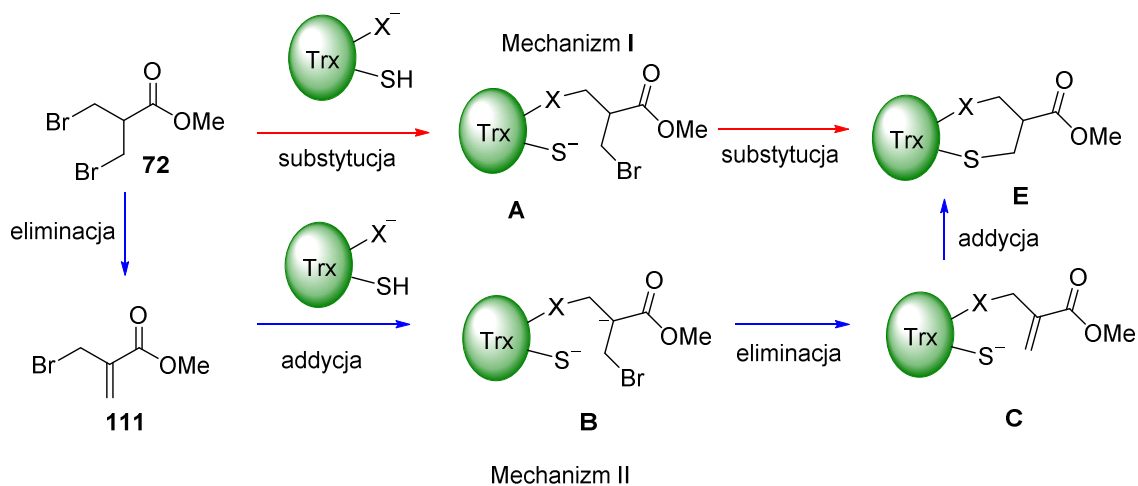
^aKomórki mysiego raka sutka; ^bKomórki raka trzustki; ^cAktywność wobec rekombinowanego systemu Trx-TrxR; ^dn/o – nie oznaczano

Do celów porównawczych zastosowano związki: PX-12 oraz **64**. Wartości parametru IC₅₀ dla oznaczeń enzymatycznych oraz wartości LD₅₀ dla oznaczeń w modelu komórkowym zaprezentowano w Tabeli 1. Wartość IC₅₀ reprezentuje stężenie, przy którym enzym wykazywał 50% aktywności względem układu bez inhibitora. Wartość LD₅₀ oznacza natomiast stężenie badanego inhibitora, które powoduje spadek populacji żywych komórek o 50% względem układu bez inhibitora.

¹²⁰ Klossowski, S., Muchowicz, A., Redzej, A., Swiech, M., Firczuk, M., Gołąb, J., Ostaszewski, R., *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 55

Związek referencyjny PX-12 hamował aktywność układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny w stosowanych warunkach, co potwierdzało prawidłowe działanie testu. Stężenie tego związku, przy którym układ Trx-TrxR zachowywał 50% swojej aktywności wynosiło 12 μM . Związek **64** wykazywał dużo niższe IC_{50} w oznaczeniu na rekombinowanym enzymie i wyniosło ono 1.2 μM . Wartości IC_{50} wyznaczone dla badanych peptydomimetyków **103a-c** były znacznie większe od wartości dla PX-12. Związek PX-12 wykazywał również efekt cytotoksyczny/cytostatyczny w modelach komórkowych i jego LD_{50} wyniosło 11.6 μM dla komórek mysiego raka sutka (EMT6) oraz 3.9 μM dla komórek raka trzustki (Tabela 1, l.p. 1). Związek **64** nie wykazywał dla tych komórek efektu cytotoksycznego w badanym stężeniu (Tabela 1, l.p. 2).

Badania biologiczne wykazały, iż peptydomimetyki **103** nie są aktywne względem układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny w badanych stężeniach (50 μM), pomimo faktu, iż zawierają ten sam fragment co związek **64**. Sam ester **64**, pomimo bardzo wysokiej aktywności wobec rekombinowanego układu TrxR-Trx, nie wykazuje efektu cytotoksycznego na komórkach rakowych, co potwierdza jego bardzo niski potencjał terapeutyczny.



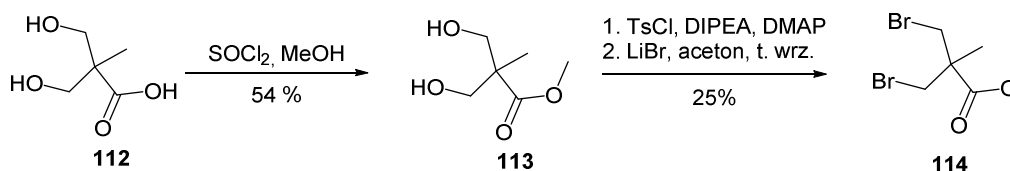
Schemat 35. Możliwe mechanizmy działania związku **64**. Mechanizm I: **64**→**A**→**E** (czerwony); Mechanizm II: **64**→**111**→**B**→**E** (niebieski).

Ze względu na brak aktywności związków **103**, przeanalizowano inne możliwe mechanizmy działania związku **64**. Oprócz zaproponowanego początkowo mechanizmu I (kolor czerwony, Schemat 35), możliwe jest, że związek **64** w warunkach eksperymentu ulega reakcji eliminacji tworząc ester metylowy kwasu 2-(bromometylo)akrylowego (**111**) na drodze reakcji eliminacji bromowodoru (mechanizm II, niebieski, Schemat 35). Związek **111** może alkilować enzym, w reakcji addycji reszty cysteiny do wiązania

podwójnego, tworząc addukt **B**. Z adduktu **B**, w następnym etapie, eliminacja anionu bromkowego może prowadzić do tworzenia się adduktu **C**. Addukt **C** może poprzez kolejną reakcję addycji Michaela przekształcać się w makrocycliczny związek **E** o strukturze zaproponowanej poprzednio (Schemat 35).

W celu zaprojektowania aktywnych peptydomimetyków, należało sprawdzić, który z przedstawionych mechanizmów inhibicji Trx-TrxR jest bardziej prawdopodobny. Wyniki badań na izolowanym układzie sugerują, że Mechanizm I jest mniej prawdopodobny, jednak na tym etapie nie można go całkowicie wykluczyć. Aby określić czy alkirowanie przebiega przez utworzenie związku **111** lub adduktu **C** z wiązaniem podwójnym (mechanizm niebieski), zaproponowano strukturę związku modelowego **114** (Schemat 36). Związek ten posiada dodatkową grupę metylową, która uniemożliwia eliminację cząsteczki bromowodoru, przez co związek ten nie może działać mechanizmem II. Porównanie aktywności związków: **64**, **114** oraz **111** pozwoli przybliżyć możliwy mechanizm i przez to określić dalszy kierunek syntezy nowych inhibitorów.

Przeprowadzono syntezę związku **114**. Estryfikacja kwasu **112** prowadziła do estru metylowego **113** z wydajnością 54%. Związek ten został następnie poddany reakcji z chlorkiem tosyłu. Otrzymany diester tosyłowy został od razu użyty w reakcji z bromkiem litu, prowadzącej do oczekiwanego związku **114**, z wydajnością 25% (dla dwóch etapów).



Schemat 36: Synteza związku **114** do badań modelowych nad mechanizmem alkirowania

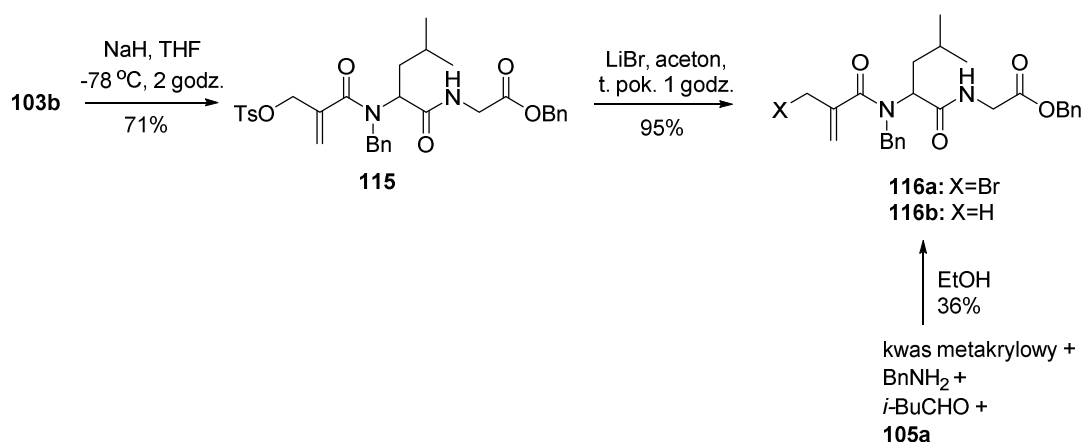
Otrzymany związek **114** oraz związek **111** został następnie przebadany w teście enzymatycznym. Badania aktywności biologicznej (Tabela 1, l.p.7,8) wykazały iż związek **114** jest nieaktywny w badanych stężeniach. Związek **111** jest natomiast prawie trzykrotnie bardziej aktywny niż badany wcześniej związek **64**. Wyniki te sugerują iż alkirowanie cystein w tioredoksynie prawdopodobnie nie zachodzi poprzez reakcję podwójnego podstawienia, zatem Mechanizm II (niebieski) jest bardziej prawdopodobny.

Ten etap badań, a w szczególności wyniki badań w modelach komórkowych pokazują, że pomimo bardzo dobrych aktywności w teście enzymatycznym, związki **64** i **111** nie są cytotoksyczne/cytostatyczne względem komórek nowotworowych (w stężeniach do 50

μM). Oznacza to, że związki **64** i **111** te prawdopodobnie nie docierają do celu komórkowego i przez to nie wykazują efektu przeciwnowotworowego.

5.2.3. Badania nad opracowaniem metody syntezy związków z grupą 2-(bromometylo)akrylową

Badania modelowe wykazały, że związek **111**, zawierający aktywowane wiązanie podwójne oraz grupę opuszczającą w postaci anionu bromkowego, jest efektywnymi inhibitorem układu tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny. Ponieważ związek ten nie wykazuje działania wobec komórek nowotworowych, w kolejnym etapie, przeprowadzono badania nad metodą syntezy peptydomimetyków, zawierających fragment związku **111**. Zaproponowano struktury peptydomimetyków **115** oraz **116a**, w których fragment elektrofilowy składa się z aktywowanego wiązania podwójnego oraz grupy opuszczającej X (X = TsO, Br, Schemat 37). Dodatkowo zaproponowano syntezę związku **116b** (X = H), który zawiera tylko akceptor Michaela, bez grupy opuszczającej.



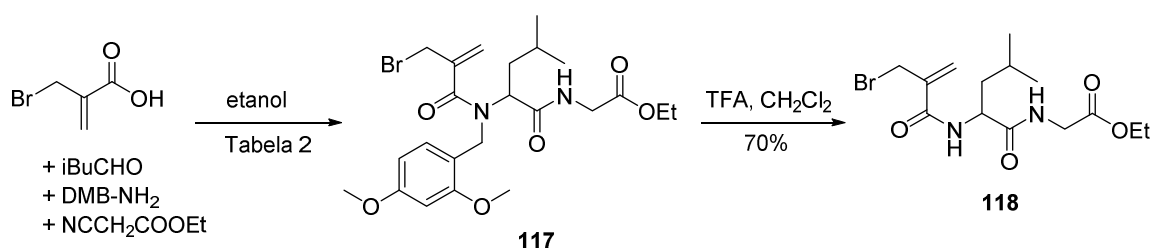
Schemat 37. Synteza związków z wykorzystaniem związku **103b**

Do syntezy tej grupy związków zastosowano dwie metody syntezy. Pierwsza z nich polegała na przekształceniu otrzymanego wcześniej związku **103b** w związek nienasycony **115** w reakcji eliminacji cząsteczki kwasu 4-toluenosulfonowego. Do tego celu wykorzystano początkowo aminy trzeciorzędowe. Zbadano wpływ różnych amin na reakcję eliminacji stosując następujące reagenty: DIPEA, TEA, DMAP, DBU. Nie zaobserwowano jednak tworzenia się produktu **115**. Modyfikacja warunków prowadzonej reakcji, polegająca na zastosowaniu wodoru sodu w tetrahydrofuranie (THF), prowadziła do otrzymania związku **115** wydajnością 71%. Następnie, związek **115** użyty został w reakcji z bromkiem litu tworząc peptydomimetyk **116a**, z fragmentem 2-(bromometylo)akrylowym, z wydajnością 95%. Związek **116b** otrzymano z wydajnością

36% stosując reakcję Ugiego, w której jednym z reagentów był kwas metakrylowy (Schemat 37).

Przeprowadzono również badania nad opracowaniem metody syntezy związku **118** zawierających grupę 2-(bromometylo)akrylową jednak bez grupy alkilowej przy wiązaniu amidowym (Schemat 38). W tym celu, zastosowano kwas 2-(bromometylo)akrylowy w reakcji Ugiego. Kwas ten był już opisany jako substrat w reakcji Ugiego, jednak wydajności reakcji z nim były niskie.¹²¹ Najprawdopodobniej spowodowane to było szeregiem reakcji ubocznych jakim może ulegać ten kwas w warunkach reakcji Ugiego.

Zastosowano procedurę wykonania reakcji Ugiego, używaną we wcześniejszych etapach badań, wykorzystując jako substraty kwas 2-(bromometylo)akrylowy, 2,4-dimetoksybenzylaminę, aldehyd izowalerianowy oraz izocyjanooctan etylu. W reakcji zaobserwowano tworzenie się peptydomimetyku **117** z niewielką wydajnością (<10%).



Schemat 38. Reakcja Ugiego z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym i reakcja usunięcia grupy dimetoksybenzylowej.

Przeprowadzono optymalizację warunków reakcji stosując m. in. różne rozpuszczalniki oraz procedury eksperymentalne (Tabela 2). Przy zastosowaniu standardowej procedury (Tabela 2, procedura A), niezależnie od rozpuszczalnika produkt nie powstawał lub tworzył się z niską wydajnością (Tabela 2, l.p. 1-5). Zmiana kolejności dodawania substratów (Procedura B) skutkowała wzrostem wydajności reakcji, przy jednoczesnym skróceniu jej czasu (Tabela 2, l.p. 6). Dodatkowe obniżenie temperatury reakcji spowodowało wzrost wydajności do 61%.

Badania te wykazały, że dla reakcji Ugiego z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym kluczowa jest kolejność dodawania substratów oraz niska temperatura prowadzenia reakcji. Obecność izocyjanooctanu etylu przed dodaniem kwasu 2-(bromometylo)akrylowego w niskiej temperaturze prawdopodobnie ogranicza zachodzenie

¹²¹ Greef de, M.; Abeln, S.; Belkamsi, K.; Dömling, A.; Orru, V. A. R.; Wessjohann, A. L. *Synthesis* **2006**, 23, 3997

reakcji ubocznych, co sześciokrotnie podniosło wydajność reakcji. Zoptymalizowane warunki reakcji zastosowano do syntezy związku **117**.

Tabela 2. Optymalizacja warunków reakcji Ugiego z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym

L.p.	Procedura	Rozpuszczalnik	Temperatura	Wydajność
1	A	Etanol	t. pok.	<5%
2	A	Etanol	0 °C	11%
3	A	Chloroform	0 °C	0%
4	A	Tetrahydrofuran	0 °C	0%
5	A	-	0 °C	0%
6	B	Etanol	0 °C	34%
7	B	Etanol	-78 °C ^a	61%

Procedura A: Do roztworu 2,4-dimetoksybenzyloaminy dodano aldehyd izowalerianowy i mieszano przez 15 min. Dodano kwas 2-(bromometylo)akrylowy i mieszano przez kolejne 15 min. Dodano izocyjanooctan etylu w podanej temperaturze. Następnie mieszano przez 24 godziny w podanej temperaturze.

Procedura B: Do roztworu 2,4-dimetoksybenzyloaminy dodano aldehyd izowalerianowy i mieszano przez 15 min. Mieszaninę schłodzono do podanej temperatury, dodano izocyjanooctan etylu i kwas 2-(bromometylo)akrylowy. Mieszano przez 6 godzin w podanej temperaturze. ^aIzocyjanek i kwas 2-(bromometylo)akrylowy dodano w 0 °C, następnie schłodzono do -78 °C

Zastosowanie 2,4-dimetoksybenzyloaminy, zamiast benzyloaminy, umożliwiło usunięcie grupy 2,4-dimetoksybenzylowej, jak opisano w rozdziale 2.1.2, z użyciem 20%_{obj} kwasu trifluorooctowego w chlorku metylenu. Stosując tę reakcję, otrzymano peptydomimetyk **118** z wydajnością 70% (Schemat 38).

5.2.3.1. Wyniki badań biologicznych nad aktywnością peptydomimetyków zawierających aktywowane wiązanie podwójne.

Otrzymane na tym etapie peptydomimetyki zawierające akceptory Michaela zostały poddane badaniom biologicznym. W Tabeli 3 przedstawiono wyniki aktywności biologicznej tych związków. Dla porównania umieszczono również aktywności dla związków referencyjnych (PX-12, **64**). Najwyższe IC₅₀, spośród aktywnych związków, odnotowano dla peptydomimetyku z grupą estru tosyłowego (l.p. 3). Lepsze aktywności wyznaczono dla związków zawierających fragment 2-(bromometylo)akrylowy (**116a**, **117**). Wartości IC₅₀ tych związków były nieznacznie wyższe od związku PX-12 (l.p. 4,6, Tabela 3). Najniższe wartości IC₅₀ otrzymano dla peptydomimetyku **118** bez grupy

zabezpieczającej przy wiązaniu amidowym. Aktywność tego związku była zbliżona do związku **64** (l.p. 7, Tabela 3). Peptydomimetyk **116b** zawierający pojedynczy akceptor Michaela nie był aktywny w badanych warunkach (l.p. 5).

Jak wynika z badań biologicznych, peptydomimetyki zawierające aktywowane wiązanie podwójne oraz grupę opuszczającą były aktywne w teście na rekombinowanym układzie tioredoksyna – reduktaza tioredoksy. Najbardziej aktywne były peptydomimetyki z fragmentem 2-(bromometylo)akrylowym, dla których IC₅₀ było niższe niż dla związku referencyjnego PX-12. Ponadto wykazano, że obecność jedynie pojedynczego akceptora Michaela, jak ma to miejsce w związku **116b**, nie jest wystarczająca dla uzyskania aktywności względem układu Trx-TrxR. Potwierdza to duże znaczenie obecności podwójnego centrum elektrofilowego w strukturach otrzymanych inhibitorów i jest zgodne z proponowanym mechanizmem działania (Schemat 35).

Tabela 3. Aktywność biologiczna związków zawierających akceptor Michaela

L.p.	Związek	IC ₅₀ [μM]	LD ₅₀ [μM]	
			EMT6	Panc02
1	PX-12	12.3 ± 0.6	11.6	3.9
2	64	1.2 ± 0,8	>50	>50
3	115	22.3 ± 4.2	>50	>50
4	116a	10.0 ± 0.7	>50	>50
5	116b	>50	>50	>50
6	117	8.9 ± 1.6	>50	>50
7	118	2.4 ± 0.5	>50	>50

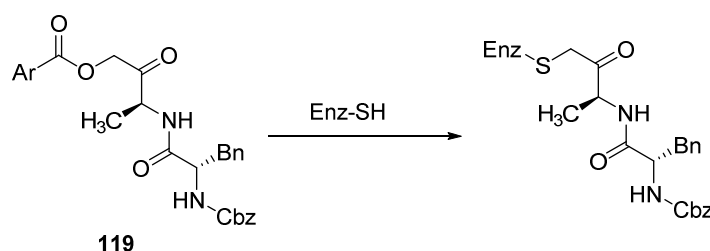
Ponieważ uzyskane związki były aktywne w testach enzymatycznych, przeprowadzono również badania cytotoksyczności w modelach komórek nowotworowych raka sutka (EMT6) oraz raka trzustki (Panc02). Niestety, pomimo wysokiej aktywności w warunkach rekombinowanego testu, żaden z badanych peptydomimetyków, nie wykazywał aktywności cytotoksycznej wobec badanych komórek (Tabela 3).

Pomimo braku aktywności w modelach komórkowych, wysoka aktywność w testach enzymatycznych sugeruje, że związki zawierające fragment elektrofilowy zbudowany z akceptora Michaela oraz grupy opuszczającej mogą być efektywnymi

inhibitorami układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny. Brak aktywności w układach komórkowych może być natomiast spowodowany niską stabilnością 2-(bromometylo)akryloamidów w mediach biologicznych. Dlatego w kolejnym etapie badań zaproponowano inny rodzaj grupy opuszczającej zamiast atomu bromu.

5.2.4. Badania nad metodą syntezy β -acyloksymetakryloamidów

Jak wykazano w poprzedniej części badań, aniony halogenkowe oraz estry tosyłowe są bardzo dobrymi grupami odchodzącymi. Dzięki temu mogą efektywnie alkilować reszty cysteiny w tioredoksynie lub reduktazie tioredoksyny, co prawdopodobnie sprawia, że związki te są aktywne wobec izolowanego układu Trx-TrxR. Z drugiej strony, substancje takie są bardzo reaktywne i w układach biologicznych mogą ulegać wielu reakcjom, co może prowadzić do ich degradacji. Z tego powodu, do dalszych badań zaproponowano inną grupę, która może działać jako grupa odchodząca, a mianowicie anion kwasu karboksylowego. Zainspirowane to było studium literaturowym nad pracami Wagnera i jego zespołu, który opisał w 1994 α -acyloksyketon **119**, będący inhibitorem proteazy cysteinowej.¹²²



Schemat 39. α -Acyloksyketony jako inhibitory proteaz cysteinowych

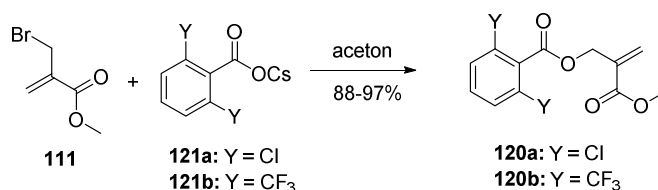
Autorzy tej pracy zaproponowali mechanizm działania inhibitora **119**, w którym kwas arylokarboksylowy pełnił rolę grupy opuszczającej w reakcji alkilowania cysteiny w proteazie (Schemat 39). Bazując na tych danych, zaproponowano wykorzystanie anionów kwasów arylokarboksylowych jako grupy odchodzącej w otrzymanych peptydomimetykach.

5.2.4.1. Badania modelowe nad aktywnością biologiczną związków z grupą β -acyloksymetakrylową.

W celu weryfikacji tej koncepcji zastosowania nowych grup odchodzących, przeprowadzono badania modelowe nad aktywnością biologiczną związków zawierających

¹²² Krantz, A.; Copp, L. J.; Coles, P. J.; Smith, R. A.; Heard, S. B. *Biochemistry* **1991**, *30*, 4678

fragment β -acyloksymetakrylowy. Zaproponowane struktury związków modelowych **120a** oraz **120b** przedstawiono na Schemacie 40.



Schemat 40. Synteza związków modelowych z grupą β -acyloksymetakrylową.

Jako grupy odchodzące zastosowano kwasy arylokarboksylowe: 2,6-dichlorobenzoesowy oraz kwas 2,6-bis-(trifluorometylo)benzoesowy. Związki **120a** i **120b**, otrzymano ze związku **111** na drodze estryfikacji solami cesowymi kwasów karboksylowych. Gdy sól cesową kwasu **121a** generowano *in situ* w DMF z kwasu karboksylowego i węglanu cezu, nie otrzymano oczekiwanego produktu **120a**. Dlatego zastosowano sole cesowe kwasów przygotowane uprzednio w THF z niewielkim dodatkiem wody (ok. 2%_{obj}). Tak utworzone sole **121a,b** wprowadzono w reakcję z estrem **111**, otrzymując związki **120a,b**. Początkowo do reakcji ze związkiem **111** wykorzystano DMF jako rozpuszczalnik. Dalsze badania wykazały jednak, że produkty **120a,b** powstają również w acetonie, z porównywalną wydajnością. Biorąc pod uwagę względy praktyczne, ostatecznie używano acetonu jako rozpuszczalnika do reakcji substytucji. W wyniku reakcji estru **111** z solami **121a** i **121b** w acetonie, otrzymano oczekiwane związki modelowe z wydajnościami 88% (**120a**) i 97% (**120b**).

Otrzymane estry przebadano w teście enzymatycznym na izolowanym układzie Trx-TrxR. Stężenia IC₅₀ dla otrzymanych związków modelowych były bardzo niskie i wynosiły 0.4 μM dla estru **120a**, oraz 0.2 μM dla estru **120b**. Oba związki, podobnie jak estry **111** i **64** nie były jednak aktywne w modelach komórkowych (EMT5 oraz Panc02).

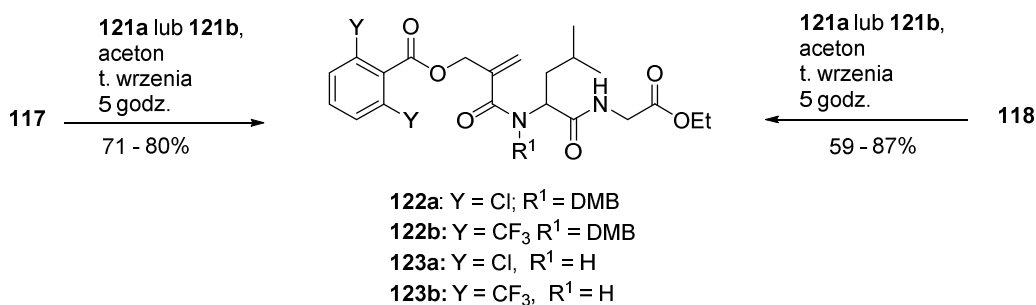
Tabela 4. Wyniki aktywności biologicznej dla związków modelowych **120a,b**

L.p.	Związek	IC ₅₀ [μM]	LD ₅₀ [μM]
1	64	1.2	>50
2	111	0.4	>50
3	120a	0.2	>50
4	120b	0.4	>50

5.2.4.2. Badania nad syntezą peptydomimetyków z fragmentem β -acyloksymetakrylowym.

Wyniki badań na związkach modelowych potwierdziły efektywność fragmentu β -acyloksymetakrylowego w inihbicji układu tioreodkysna – reduktaza tioredoksyny. W kolejnym etapie badań opracowano syntezę peptydomimetyków z opisanym fragmentem (Schemat 41). Do syntezy związków **122a,b** i **123a,b** zastosowano opracowaną wcześniej metodę, polegającą na wykorzystaniu soli cesowej kwasów 2,6-dichlorobenzoesowego (**121a**) i *bis*-(2,6-trifluorometylo)benzoesowego (**121b**) w reakcji z peptydomimetykami **117** i **118** (Schemat 41).

W reakcji peptydomimetyku **117**, z wiązaniem amidowym zabezpieczonym grupą 2,4-dimetoksybenzylową, w acetonie otrzymano odpowiednie peptydomimetyki **122a,b** z wydajnością odpowiednio 71% i 80%. Peptydomimetyk **118** w reakcji z solami cesowymi prowadził do otrzymania produktów **123a** oraz **123b** z wydajnościami odpowiednio 59% i 87% (Schemat 41).



Schemat 41. Synteza β -acyloksymetakryloamidów z wykorzystaniem reakcji estryfikacji solą cesową kwasów karboksylowych

Istotną zaletą otrzymanych związków **123a,b** była znacząca poprawa stabilności w porównaniu do związków z fragmentem 2-(bromometylo)akrylowym. Związek **123b** był stabilny przez wiele miesięcy w temperaturze 3 °C, podczas gdy peptydomimetyk **117** ulegał w tym czasie rozkładowi (TLC).

5.2.4.3. Wyniki badań biologicznych nad aktywnością β -acyloksyakryloamidów

Otrzymane w tej części badań β -acyloksyakryloamidy zostały poddane badaniom biologicznym, a ich wyniki przedstawiono w Tabeli 5. Związki **122a,b** posiadające zabezpieczone wiązanie amidowe grupą 2,4-dimetoksybenzylową były nieaktywne w testach na izolowanym enzymie (Tabela 5, l.p. 3,4). Niskie wartości IC₅₀ otrzymano natomiast dla związków **123a,b**, które nie posiadały grupy 2,4-dimetoksybenzylowej

w swojej strukturze. Stężenia IC₅₀ były zbliżone do tych, wyznaczonych dla związku **64**. Z uwagi na brak aktywności związków **122a,b**, badania komórkowe wykonano dla związków **123a,b**. Dla tych związków zaobserwowano wyraźne działanie przeciwnowotworowe. Dla komórek mysiego raka sutka (EMT6) wartości LD₅₀ związków **123a,b** były porównywalne do PX-12. Natomiast efekt cytotoksyczny peptydomimetyków **123a,b** był silniejszy od efektu PX-12 wobec komórek raka trzustki (Tabela 5, l.p. 5,6).

Wyniki te pokazują wyraźnie, że β -acyloksyakryloamidy są efektywnymi inhibitorami układu tioreoksyna – reduktaza tioredoksyny, co pozostaje w zgodności z wynikami badań na związkach modelowych. Kluczowym aspektem dotyczącym struktury peptydomimetyku jest obecność grupy 2,4-dimetosybenzylowej. Peptydomimetyki posiadające tę grupę były nieaktywne w badanych stężeniach wobec izolowanego układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny. Możliwe, że przyczyną braku aktywności, w przypadku tych związków, był zbyt duży rozmiar cząsteczki. Usunięcie tej grupy i otrzymanie związków **123a,b** skutkowało uzyskaniem bardzo efektywnych inhibitorów układu Trx-TrxR. Dla związków **123a,b** bardzo ważna jest również aktywność w modelu komórkowym. Peptydomimetyki te wykazują silny efekt cytotoksyczny wobec obu badanych linii komórek nowotworowych.

Tabela 5. Aktywność biologiczna β -acyloksyakryloamidów

L.p.	Związek	IC ₅₀ [μ M]	LD ₅₀ [μ M]	
			EMT6	Panc02
1	PX-12	12.3 \pm 0.6	11.6	3.9
2	64	1.2 \pm 0,8	>50	>50
3	122a	>50	>50	>50
4	122b	>50	>50	>50
5	123a	3.3	5.2	3.8
6	123b	3.0	5.5	3.0

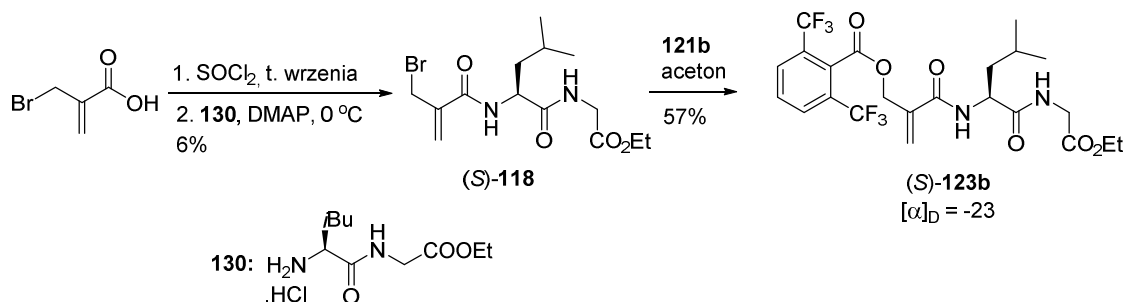
Brak aktywności w modelach komórkowych związków modelowych **120a** i **120b** wobec wysokiej aktywności peptydomimetyków **123a,b** z tym samym fragmentem elektrofilowym, dobrze koresponduje z założeniami niniejszej pracy. Badania te wykazały,

że połączenie fragmentu elektrofilowego z fragmentem peptydomimetyków znacząco wpływa na uzyskaną aktywność prawdopodobnie zwiększając prawdopodobieństwo dotarcia inhibitora do komórki. Dzięki temu, otrzymane peptydomimetyki wykazują silne działanie przeciwnowotworowe.

5.3. Badania nad opracowaniem chemoenzymatycznej metody syntezy nowego pomocnika chiralnego do reakcji Ugiego

W rozdziale 5.2. opracowano ogólną metodologię umożliwiającą otrzymanie racemicznych peptydomimetyków z grupą β -acyloksymetakrylową. W kolejnym etapie badań, konieczne było opracowanie metody, za pomocą której możliwe jest otrzymanie poszczególnych enancjomerów peptydomimetyków **123a,b** z grupą β -acyloksymetakrylową.

Podjęto próbę otrzymania enancjomerycznie czystego związku **123b**, wykorzystując klasyczne metody sprzęgania. W tym celu wykonano syntezę enancjomerycznie czystego dipeptydu **130** z *L*-leucyny, według opisanej wcześniej procedury.¹²³ Przeprowadzono reakcje sprzęgania z zastosowaniem różnych czynników sprzęgających: EDC, DCI, CDI. W żadnym przypadku nie otrzymano związku (*S*)-**118**. Dopiero, w wyniku trójetapowej syntezy z chlorkiem kwasu 2-(bromometylo)akrylowego otrzymano związek **123b** (Schemat 42). Wydajność reakcji sprzęgania była jednak bardzo niska (6%), dlatego ta metoda syntezy nie była efektywna dla tej grupy związków.



Schemat 42. Synteza związku (*S*)-**123b** metodą klasycznego sprzęgania

Prawdopodobnym powodem niskich wydajności reakcji sprzęgania z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym jest obecność trzech centrów elektrofilowych w aktywowanej formie tego kwasu. Może to prowadzić do wielu reakcji ubocznych z grupą aminową pochodzącą od związku **130**. Grupa aminowa może bowiem reagować z innym fragmentem cząsteczki kwasu (np. z atomem bromu lub wiązaniem podwójnym), nie zaś z aktywowaną grupą karbonylową.

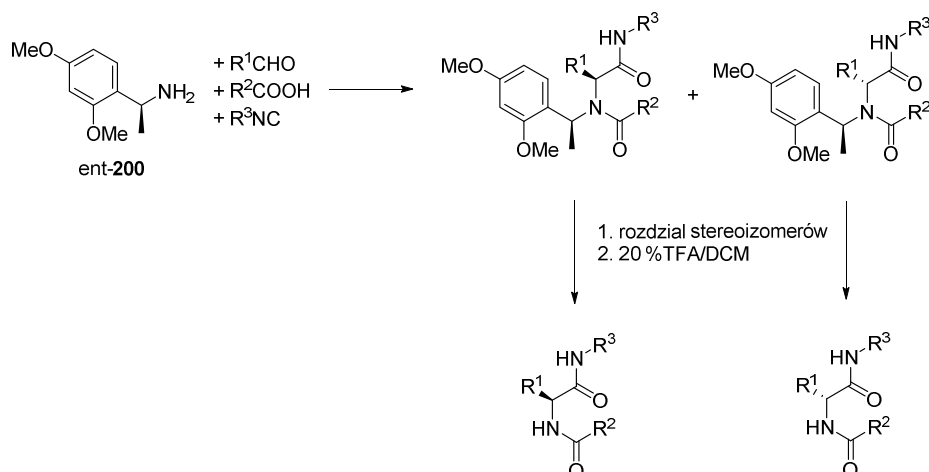
Reakcja Ugiego z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym była dużo bardziej efektywna w syntezie tych peptydomimetyków, ponieważ w tej reakcji kwas karboksylowy pełni rolę nukleofila (Schemat 2). Ponadto reakcja Ugiego zachodzi w niskiej temperaturze, co prawdopodobnie ogranicza zachodzenie reakcji ubocznych i wpływa korzystnie na

¹²³ Frelek, J., Fryszkowska, A., Kwit, M., Ostaszewski, R., *Tetrahedron: Asym.*, **2006**, *17*, 2469

wydajność otrzymywanego produktu reakcji. Z tego powodu podjęto próby wykorzystania reakcji Ugiego do syntezy nieracemicznego peptydomimetyku **123b**.

W części teoretycznej opisano szereg przykładów zastosowania chiralnych amin w diastereoselektywnym wariacie reakcji Ugiego. Nie zostały jednak opisane dogodne metody usuwania tych amin z produktu reakcji, które mogłyby być zastosowane do syntezy związku **123b**. Teoretycznie, możliwe jest zastosowanie 1-fenyletyloaminy w reakcji Ugiego. Grupa benzyłowa może być usunięta w warunkach redukujących (np. wodór na palladzie).¹²⁴ Ta metoda nie może być jednak zastosowana w obecności reaktywnego wiązania podwójnego.

W celu opracowania ogólnej metody syntezy chiralnych, nieracemicznych peptydomimetyków opisanych w rozdziale 5.2., konieczne więc było zastosowanie nowego pomocnika chiralnego, który mógłby być użyty jako „chiralny ekwiwalent amoniaku” w reakcji Ugiego.



Schemat 43. Koncepcja wykorzystania 1-(2,4-dimetoksyfenyl)etyloaminy (**200**) do syntezy chiralnych peptydomimetyków

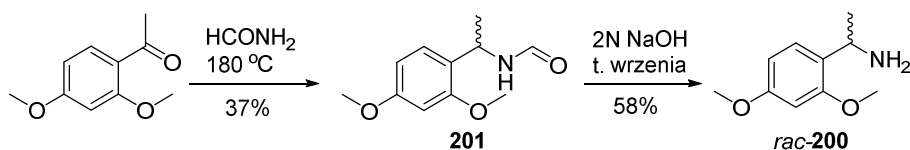
Jak już wcześniej pokazano, 2,4-dimetoksybenzyloamina jest stosowana jako ekwiwalent amoniaku w reakcji Ugiego i może być w prosty sposób usunięta ze struktury otrzymanych wcześniej peptydomimetyków poprzez zastosowanie kwasu trifluorooctowego. Bazując na tych wynikach, zaproponowano wykorzystanie chiralnego analogu 2,4-dimetoksybenzyloaminy; 1-(2,4-dimetoksyfenyl)etyloaminy (**200**) jako pomocnika chiralnego do reakcji Ugiego. Z racji analogii do DMBA powinno być możliwe zastosowanie aminy **200** w reakcji Ugiego i usunięcie jej ze struktury otrzymanego peptydomimetyku w analogicznych warunkach co grupę 2,4-dimetoksybenzyłową.

¹²⁴ Ding, K., Chen, J., Ji, M., Wu, X., Varady, J., Yang, C-Y, Lu, Y., Deschamps, J. R., Levant, B., Wang, S., *J. Med Chem.*, **2005**, *48*, 3171

Koncepcja syntezy nieracemicznych peptydomimetyków, z użyciem tej aminy, zakłada rozdział otrzymanych diastereoizomerów, które mogą być następnie odbezpieczone, dzięki czemu możliwe będzie otrzymanie obu enancjomerów **123b** (Schemat 43).

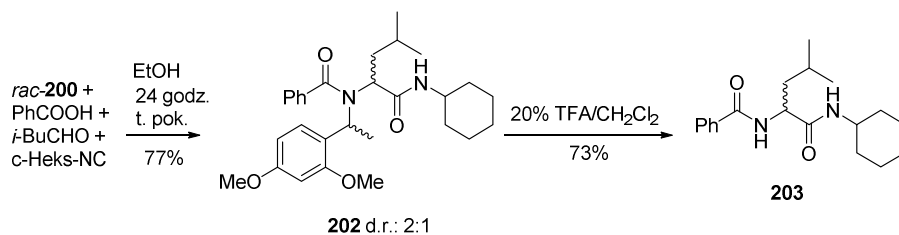
5.3.1. Synteza racemicznej 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy

W literaturze nie została opisana metoda syntezy nieracemicznej 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy. Racemiczną aminę **200** otrzymano według zmodyfikowanej metody opisanej w literaturze.¹²⁵ W pierwszym etapie zastosowano reakcję Leukcharta, 2,4-dimetoksyacetofenonu z generowanym *in situ* formamidem, w wyniku której otrzymano amid **201** z wydajnością 37%. W kolejnym etapie, zastosowano 2N kwas solny w celu hydrolizy formamidu **201** jak opisano w literaturze. W tych warunkach nie zaobserwowano tworzenia się związku **200**, dlatego przeprowadzono hydrolizę zasadową. Reakcja z wodorotlenkiem sodu prowadziła do otrzymania racemicznej 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy z wydajnością 58% (Schemat 44).



Schemat 44. Synteza racemicznej 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy.

Tak otrzymaną racemiczną aminę **200** zastosowano w modelowej reakcji Ugiego z kwasem benzoowym, aldehydem izowalerianowym oraz izocyjankiem cykloheksylowym, otrzymując związek **202** z wydajnością 77% (Schemat 45). Następnie przeprowadzono reakcję związku **202** z kwasem trifluoroctowym w wyniku której otrzymano odbezpieczony peptydomimetyk **203** z wydajnością 73%. Potwierdzono w ten sposób możliwość usunięcia fragmentu aminy **200** z produktu reakcji Ugiego w tych samych warunkach, co grupę DMB, co z kolei uzasadnia dalsze badania nad syntezą nieracemicznej aminy **200**.



Schemat 45. Reakcja modelowa wykorzystująca racemiczną aminę **200**.

¹²⁵ Dem'yanovich, V. M.; Shishkina, I. N., *Russ. J. Org. Chem.*, **1996**, *32*, 1336

5.3.2. Badania nad opracowaniem metody syntezy chiralnej nieracemicznej 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy

Jedną z podstawowych metod rozdziału enancjomerów amin pierwszorzędowych jest krystalizacja diastereoizomerycznych soli amoniowych utworzonych z chiralnym kwasem, co zostało opisane dla feniloetyloaminy oraz jej pochodnych.¹²⁶ Przeprowadzono badania nad zastosowaniem kwasów *L*-winowego oraz *D*-migdałowego do rozdziału racemicznej aminy **200**. W Tabeli 6 przedstawiono wyniki badań na tą metodą rozdziału enancjomerów. Nadmiar enancjomeryczny wyznaczono za pomocą HPLC, po uprzednim przeprowadzeniu aminy **200** w acetamid, używając bezwodnika octowego. Krystalizacja aminy **200** z kwasem *D*-migdałowym prowadziła do otrzymania aminy z nadmiarem enancjomerycznym 14% (Tabela 6, l.p. 1,2). Przy zastosowaniu kwasu *L*-winowego nie obserwowano znaczącego rozdziału enancjomerów (Tabela 6, l.p. 3,4). Wyniki te wskazują, iż ta metoda rozdziału enancjomerów 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy nie przyniosła zamierzonych rezultatów. Z tego powodu podjęto próbę opracowania metody enzymatycznego rozdziału kinetycznego racemicznej 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy.

Tabela 6. Krystalizacja aminy **200** z chiralnymi kwasami karboksylowymi.

L.p.	Kwas karboksylowy	Liczba rzutów krystalizacji	ee [%] ^a	Wydajność
1	<i>D</i> -migdałowy	1	11%	44%
2	<i>D</i> -migdałowy	3	14%	33%
3	<i>L</i> -winowy	1	<2%	49%
4	<i>L</i> -winowy	2	4%	42%

^aWyznaczone za pomocą HPLC dla amidu, otrzymanego w reakcji aminy **200** z bezwodnikiem octowym.

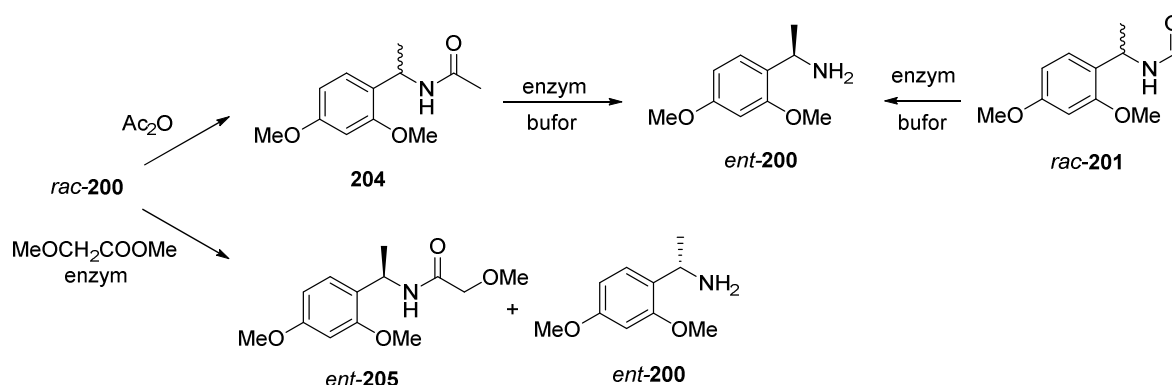
5.3.2.1. Enzymatyczny kinetyczny rozdział enancjomerów 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy

Jak opisano w rozdziale 3.2 części teoretycznej istnieje wiele przykładów enzymatycznego rozdziału kinetycznego amin pierwszorzędowych. Kluczowym aspektem wpływającym na wybór metody enzymatycznego rozdziału kinetycznego

¹²⁶ Kinbara, K., Sakai, K., Hashimoto, Y., Nohira, H., Saigo, K., *Tetrahedron Assym.*, **1996**, 7, 1539

1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy, była możliwość otrzymania tej aminy w skali preparatywnej, aby możliwe było przeprowadzenie z nią reakcji Ugięgo.

Spośród opisanych we wstępie literaturowym metod enzymatycznego rozdzielania kinetycznego amin, zdecydowano się na metody wykorzystujące hydrolazy. Wybór ten uzasadniają względy ekonomiczne oraz dostępność enzymów. Hydrolazy są również bardziej stabilne, a ich użycie do rozdzielania kinetycznego amin nie wymaga stosowania kofaktorów, co jest konieczne w przypadku użycia transaminaz. Jak pokazano w części literaturowej, przy użyciu hydrolaz, kinetyczny rozdział racemicznych amin może być przeprowadzony poprzez reakcję hydrolizy amidów lub reakcję amidowania (Schemat 46).



Schemat 46. Strategia wykorzystania enzymów do rozdzielania kinetycznego aminy 200.

W pierwszym podejściu przeprowadzono próbę enzymatycznej hydrolizy formamidu **201**, jako że jest on produktem pośrednim syntezy racemicznej aminy **200**. Przeprowadzono badania przesiewowe enzymu, który katalizowałby tę reakcję. Jako rozpuszczalnik zastosowano mieszaninę buforu (pH = 7.4)¹²⁷ i acetonu w proporcji (7:3, obj:obj). Badania te, wykazały, że żaden z dostępnych w laboratorium enzymów nie katalizował reakcji hydrolizy **201**. Analogiczne badania przesiewowe wykonano również dla reakcji hydrolizy amidu **204**, jednak i w tym przypadku nie zidentyfikowano enzymu katalizującego tę reakcję w badanych warunkach.

W kolejnym podejściu przeprowadzono badania nad zastosowaniem reakcji enzymatycznego amidowania z zastosowaniem racemicznej aminy **200**. Bazując na metodzie opracowanej przez firmę BASF (opisanej w rozdziale 3.2.1 części teoretycznej), zastosowano ester metylowy kwasu metoksyoctowego. Jako rozpuszczalnik wykorzystano toluen, ponieważ jest on dobrze tolerowany przez enzymy.¹²⁸ W wyniku badań

¹²⁷ Dla niektórych enzymów zastosowano inne pH, rekomendowane przez producenta, jeśli było podane

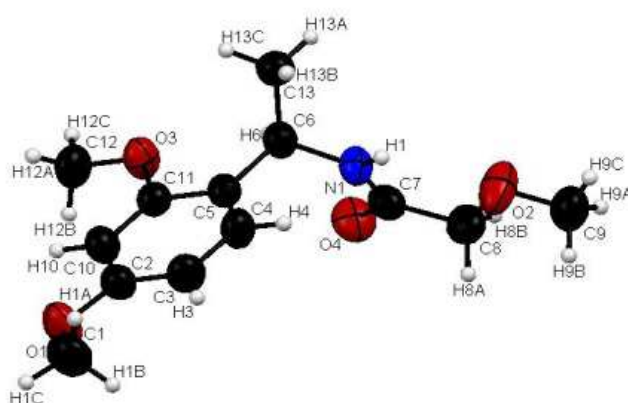
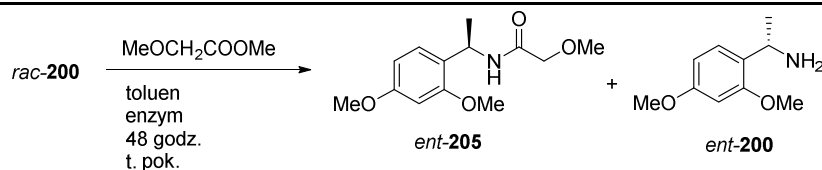
¹²⁸ a) Brodzka, A., Koszelewski, D., Ostaszewski, R., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **2012**, 82, 96 b) Brodzka, A., Koszelewski, D., Cwiklak M., Ostaszewski, R., *Tetrahedron: Asymm.*, **2013**, 24, 427

przesiewowych zidentyfikowano cztery enzymy, które katalizowały tę reakcję i określono nadmiary enancjomeryczne uzyskanych amidów **205**. We wszystkich przypadkach otrzymano produkt z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (Tabela 7). Wysoką wydajność otrzymano jednak jedynie dla immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica*. W reakcji z tym enzymem, amid **205** otrzymano z wydajnością 49% i nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 99% (Tabela 7, l.p. 4).

Tabela 7. Enzymatyczny rozdział kinetyczny aminy **200**

L.p.	Enzym	Wydajność [%] ^c	ee [%] ^b	E ^a
1	Lipaza <i>Pseudomonas sp.</i>	10%	96%	54
2	CALB (natywna)	10%	97%	73
3	Lipaza <i>Candida rugose</i>	<5%	98%	n/w
4	Novozym 435	49%	>99%	751

^aObliczona według wzoru: $E = \frac{\ln[1-cx(1+ee_p)]}{\ln[1-cx(1-ee_p)]}$, ^bee produktu **205** wyznaczone za pomocą HPLC; ^cWydajność izolowanego produktu



Rycina 4. Obraz ORTEP dla kryształu amidu **205** uzyskanego w reakcji z Novozym 435.

Po otrzymaniu właściwego kryształu amidu **205**, zostały przeprowadzone badania krystalograficzne, które potwierdziły strukturę otrzymanego amidu.¹²⁹ Badania te miały na celu określenie konfiguracji absolutnej związku **205**. Dzięki otrzymaniu odpowiedniego parametru Flacka, było możliwe określenie konfiguracji absolutnej pomimo, że związek

¹²⁹ Badania zostały wykonane przez Przemysława Kalickiego z grupy Prof. Zofii Lipkowskiej, w Instytucie Chemii Organicznej PAN.

nie zawierał atomu ciężkiego pierwiastka.¹³⁰ Na Rycinie 6 przedstawiono strukturę amidu **205**, która wskazuje, że enzym selektywnie katalizował reakcję amidowania (*R*)-1-(2,4-dimetoksyfenilo)etyloaminy.

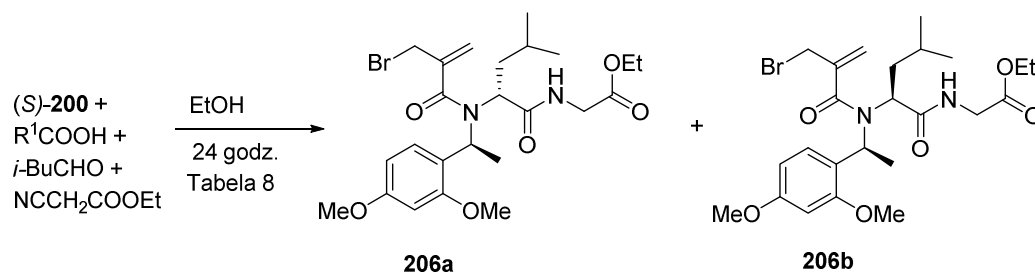
Nieprzereagowaną, optycznie czystą (ee>99%) (*S*)-1-(2,4-dimetoksyfenilo)etyloaminę odzyskano po reakcji enzymatycznej z wydajnością 42% (po redestylacji). W celu otrzymania optycznie czystej (*R*)-1-(2,4-dimetoksyfenilo)etyloaminy, przeprowadzono reakcję hydrolizy amidu **205**. Początkowo zastosowano metodę hydrolizy z Novozymem 435, którą przeprowadza się w łagodnych warunkach.⁶¹ Nie zaobserwowano jednak powstawania aminy **200** w tych warunkach. Reakcję tę przeprowadzono chemicznie, z użyciem 2N NaOH, analogicznie jak w przypadku hydrolizy **201**. Pomimo prowadzenia reakcji przez 24 godziny w temperaturze wrzenia, wciąż obserwowano znaczne ilości nieprzereagowanego amidu. Z tego też powodu zastosowano 4N NaOH z dodatkiem glikolu etylenowego (20% obj.), co umożliwiło otrzymanie (*R*)-1-(2,4-dimetoksyfenilo)etyloaminę z wydajnością 88%. Podczas reakcji hydrolizy, zaobserwowano częściową racemizację aminy (*R*)-**200** a wyznaczony nadmiar enancjomeryczny wyniósł 94%.

Główną zaletą wykorzystania opracowanej metody jest możliwość syntezy chiralnej, nieracemicznej aminy **200** w skali gramowej dzięki zastosowaniu łatwo dostępnego enzymu. Jednocześnie zastosowanie immobilizowanego katalizatora dodatkowo ułatwiało proces oczyszczania mieszaniny poreakcyjnej. Z uwagi na częściową racemizację izomeru aminu (*R*)-**200** podczas reakcji hydrolizy, w kolejnym etapie badań zastosowano optycznie czystą (*S*)-1-(2,4-dimetoksyfenilo)etyloaminę.

5.3.3. Badania nad diastereoselektywną reakcją Ugięgo z wykorzystaniem nowego pomocnika chiralnego

Reakcję Ugięgo wykonano pomiędzy kwasem 2-(bromometylo)akrylowym, chiralną aminą (*S*)-**200**, aldehydem izowalerioanowym oraz izocyjanooctanem etylu (Schemat 47). W wyniku tej przemiany otrzymano diastereoizomery **206a** i **206b**, z wydajnością 84% i w proporcji 2:3 (wyznaczona za pomocą RP-HPLC).

¹³⁰ Flack, H. D., Bernardinelli, G., *Acta Cryst.*, **1999**, A55, 908



Schemat 47. Reakcja Ugiego z (S) -1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminą

W kolejnym etapie przeprowadzono badania wpływu rozpuszczalnika i dodatku kwasu Lewisa na wydajność oraz diastereoselektywność badanej reakcji Ugiego. Wiadomo bowiem, że dodatek chlorku cynku wpływa na zwiększenie nadmiaru diastereoizomerycznego produktu.¹⁷ Z badań przeprowadzonych przez Kuntza wynika również, że stężenie reagentów ma duży wpływ na diastereoselektywność, dlatego w prowadzonych badaniach zastosowano mniejsze stężenia reagentów ($c=0.03\text{M}$).¹⁷

Tabela 8. Wpływ rozpuszczalnika oraz dodatków na reakcję Ugiego z aminą $(S)\text{-200}$

L.p.	Rozpuszczalnik	d.r. ^c	Wydajność ^d
1	EtOH ^b	40:60	84%
2	EtOH	35:65	67%
3	Toluen	30:70	23%
4	CHCl ₃	31:69	27%
5	THF	29:71	48%
6	<i>i</i> -PrOH	40:60	54%
7	AcCN	30:70	48%
8	TFE	n/w	0% ^a
9	THF + ZnCl ₂	20:80	24% ^b
10	EtOH + ZnCl ₂	23:77	11% ^b

Warunki reakcji: Temp. = -21 °C, 24 godz, Stężenia reagentów $c=0,03\text{M}$ ^a Obserwowano oskład substratów ^b Stężenie reagentów $c=0.5\text{M}$, temp. 0 °C; ^c D.r. wyznaczone z użyciem HPLC ^d Wydajność dla mieszaniny diastereoizomerów

Zastosowanie mniejszego stężenia reagentów w etanolu, nieznacznie poprawiło diastereoselektywność reakcji (Tabela 8). Diastereoselektywność reakcji w tetrahydrofuranie, toluenie oraz acetonitrylu była wyższa niż w etanolu, proporcje doastereoizomerów wynosiły około 70:30 (l.p. 3,5,7, Tabela 8). Badana reakcja nie zachodziła w trifluoroetanolu, który zastosowano ze względu na opisany pozytywny wpływ tego rozpuszczalnika na diastereoselektywność reakcji Ugiego.¹⁵ Dodatek chlorku cynku

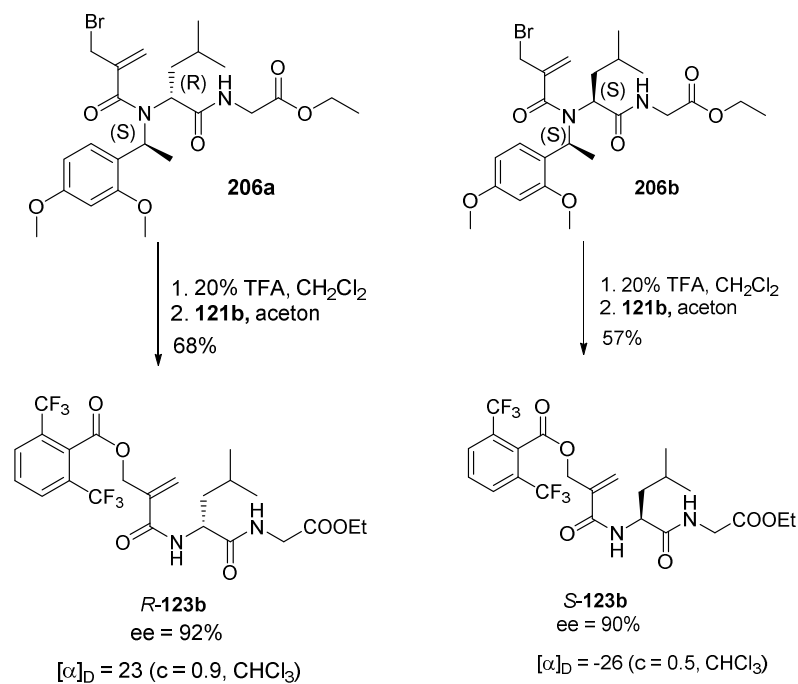
poprawił diastereoselektywność reakcji, jednak jednocześnie spowodował zmniejszenie wydajności w porównaniu do reakcji w etanolu (l.p. 9,10, Tabela 8).

Wyniki badań nad przebiegiem reakcji Ugiego z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym i aminą (*S*)-**200** pokazują, że związek **206** otrzymywany jest z najwyższą wydajnością w rozpuszczalnikach protycznych, co jest zgodne z ogólnie przyjętym mechanizmem reakcji Ugiego. Z drugiej jednak strony, diastereoselektywność reakcji Ugiego z aminą (*S*)-**200** jest wyższa w rozpuszczalnikach aprotycznych. Ponieważ celem tego fragmentu badań było otrzymanie obydwu enancjomerów związku **123b**, wybrano warunki w których wydajność reakcji była najwyższa.

5.3.4. Badania nad syntezą chiralnych nieracemicznych β -acyloksymetakryloamidów z wykorzystaniem (*S*)-1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminy

Relatywnie duża różnica w polarności diastereoizomerów **206a** i **206b** sprawiła, że było możliwe rozdzielenie stereoizomerów z wykorzystaniem metod chromatograficznych. Rozdzielone diastereoizomery **206a** i **206b** zostały następnie poddane reakcji odbezpieczenia w warunkach opisanych w rozdziale 5.3.1 z wykorzystaniem 20% roztworu kwasu trifluorooctowego. Ze względu na obecność produktów ubocznych trudnych do oddzielenia, surowa mieszanina reakcyjna została bezpośrednio poddana reakcji z solą cezową kwasu **121b**, co prowadziło do otrzymania nieracemicznych β -acyloksyakryloamidów.

Otrzymane w ten sposób peptydomimetyki (*S*)-**123b** oraz (*R*)-**123b** zostały otrzymane z bardzo dobrymi wydajnościami dla dwóch etapów – odpowiednio 57 i 68% (Schemat 48), a wyznaczone nadmiary enancjomeryczne dla obu enancjomerów wynosiły ponad 90%. Konfigurację absolutną otrzymanych enancjomerów określono poprzez pomiar skręcalności optycznej. Skręcalność optyczna związku (*S*)-**123b** otrzymanego z diastereoizomeru **206b**, wynosiła $[\alpha]_D = -26$ ($c = 0.5$, CHCl_3). Zgadza się ona z wartością skręcalności związku (*S*)-**123b** otrzymanego w wyniku sprzęgania z nieracemicznym dipeptydem **130** (Schemat 42, $[\alpha]_D = -23$ ($c = 0.8$, CHCl_3)).

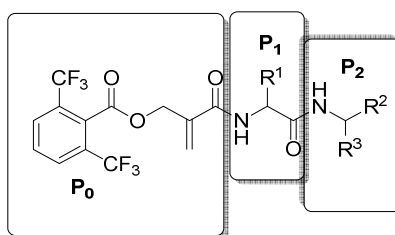


Schemat 48. Synteza enancjomerów związku **123b** z wykorzystaniem nowego pomocnika chiralnego.

Otrzymanie obu enancjomerów związku z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi uzupełniało metodologię syntezy racemicznych peptydomimetyków o wariant stereoselektywny, co pozwalało na przeprowadzanie badań biologicznych, których wyniki przedstawiono w kolejnym rozdziale. Opisane w tym rozdziale badania zostały opublikowane w *Tetrahedron Asymmetry*.

5.4. Synteza biblioteki β -acyloksymetakryloamidów do badań zależności aktywności od struktury

W kolejnym etapie badań wykorzystano opracowaną w rozdziale 5.2.4.2. metodologię do otrzymania biblioteki β -acyloksymetakryloamidów. W celu przeprowadzenia systematycznych badań, podzielono strukturę wiodącą związku **123b** na trzy fragmenty: P₀ – fragment elektrofilowy zawierający grupę β -acyloksymetakryloamidu, P₁ – fragment formalnie tworzący łańcuch boczny N-terminalnego aminokwasu we fragmencie peptydowym inhibitora, P₂ – fragment stanowiący C-terminalny koniec fragmentu peptydu (Rycina 5). Dzięki zastosowaniu reakcji Ugiego zmiana tych fragmentów nie wymagała każdorazowego wykonania wieloetapowej syntezy. W praktyce, fragment P₁ pochodził od stosowanego w reakcji Ugiego aldehydu, natomiast fragment P₂ był elementem, którego budowa była uzależniona od użytego do reakcji izocyjanku. (Rycina 5)



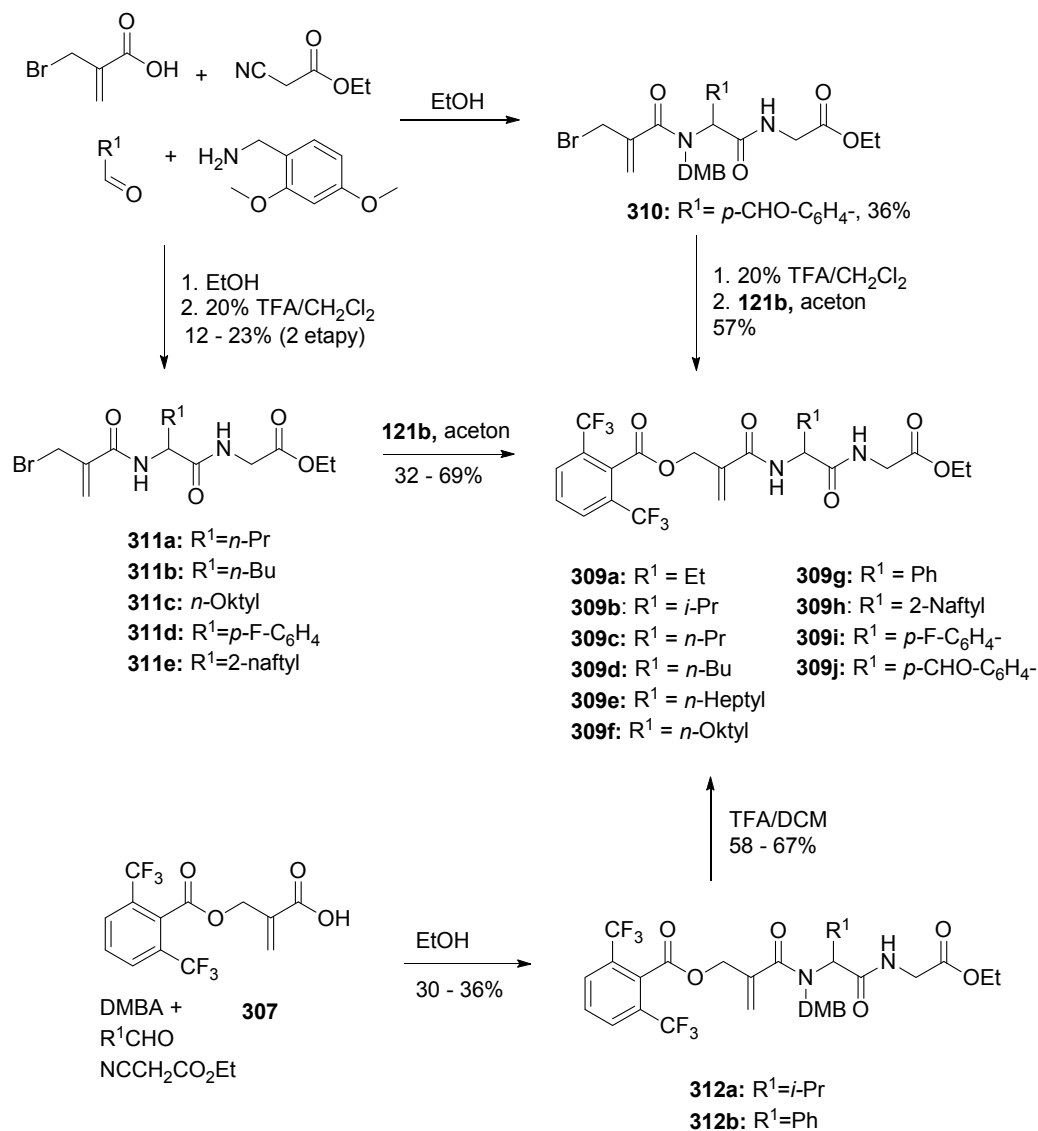
Rycina 5. Podział struktury inhibitora na optymalizowane fragmenty P₀, P₁, P₂

5.4.1. Synteza peptydomimetyków z różnymi fragmentami P₁

W celu syntezy pochodnych **123b** z różnym fragmentem P₁ przeprowadzono reakcję Ugiego z różnymi aromatycznymi oraz alifatycznymi aldehydami. Do syntezy użyto kwasu 2-(bromometylo)akrylowego, odpowiedniego aldehydu (R¹CHO), izocyjanooctanu etylu oraz 2,4-dimetoksybenzyloaminy. W następnym etapie grupę 2,4-dimetoksybenzylową usuwano w reakcji z kwasem trifluorooctowym w chlorku metylenu. Ostatnim etapem było podstawienie solą cesową kwasu 2,6-bis-(trifluorometylo)benzoesowego, prowadzące do peptydomimetyków **309a-j** (Schemat 49). W celu skrócenia metody syntezy, jeden z etapów (odbezpieczania lub podstawienia solą cesową) wykonywano z zastosowaniem surowego związku, bez oczyszczania chromatograficznego produktu pośredniego.

Do syntezy związków **311a-e** zastosowano bezpośrednią reakcję odbezpieczania produktu reakcji Ugiego. Natomiast do syntezy związku **309j** zastosowano procedurę, w której związek **310** poddawany był reakcji odbezpieczania i następnie bezpośrednio

używany był do reakcji z solą cezową (Schemat 49). Generalnie, wydajności reakcji Ugiego były niskie i rzadko przekraczały 40%. Różnice w wydajnościach zależą prawdopodobnie od równowagi reakcji tworzenia iminy z aldehydu i aminy. Jeśli równowaga ta jest przesunięta w stronę aminy, może to prowadzić do niepożądanych reakcji z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym i jednocześnie obniżyć wydajność wydajność całego procesu. Wydajności późniejszych etapów odbezpieczenia i reakcji z solą cezową zostały przedstawione na Schemacie 49.

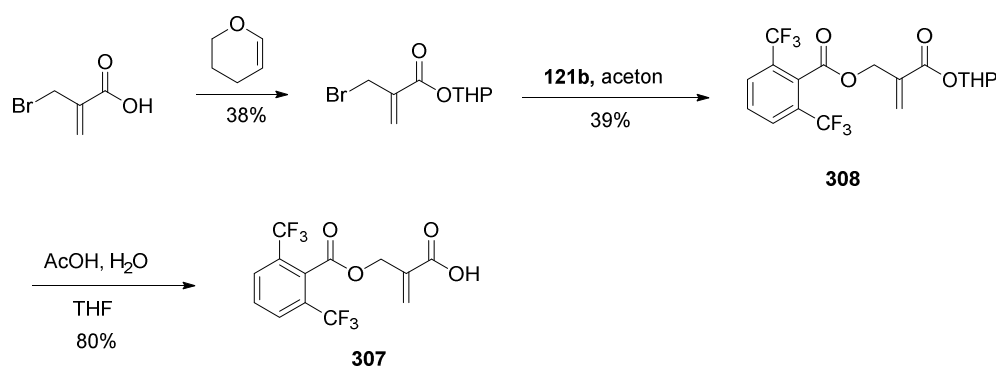


Schemat 49. Strategia syntezy peptydomimetyków z różnym fragmentem P₁.

W celu opracowania krótszej metody syntezy, zaproponowano użycie kwasu **307** zamiast kwasu 2-(bromometylo)akrylowego. W tym przypadku znacząco uprościłoby to metodę syntezy β -acyloksymetakryamidów. W celu otrzymania kwasu **307** zastosowano metodę syntezy wykorzystującą zabezpieczony kwas 2-(bromometylo)akrylowy **308** (Schemat 50). Związek ten może być estryfikowany solami cezowymi analogicznie do

związków **123a,b**. Znanych jest wiele metod zabezpieczenia grupy karboksylowej.¹³¹ Wśród nich, estry - etylowy i metylowy - kwasu 2-(bromometylo)akrylowego są dostępne komercyjnie. Selektywne usunięcie grup etoksyłowej lub metoksyłowej w obecność grupy estrowej kwasu 2,6-(trifluorometylo)benzoesowego może być jednak problematyczne. Jako rozwiązanie tego problemu, zastosowano grupę tetrahydropyranu (THP). Grupa tetrahydropyranu może być usunięta w reakcji z kwasem octowym.¹³¹

Zabezpieczony kwas został otrzymany w reakcji kwasu 2-(bromometylo)akrylowego z DHP z wydajnością 38% (Schemat 50). Następnie, tak zabezpieczoną pochodną poddano reakcji substytucji solą cesową kwasu 2,6-bis-(trifluorometylo)benzoesowego w wyniku której otrzymano związek **308**, z wydajnością 39%. W ostatnim etapie grupa THP została usunięta, co prowadziło do otrzymania związku **307** z wydajnością 80% (Schemat 50).



Schemat 50. Synteza kwasu **307**

Stosując strategię z użyciem kwasu karboksylowego **307**, otrzymano związki **309b** i **309g**. Wydajności reakcji Ugiego z kwasem karboksylowym **307** były zbliżone do tych, z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym i wynosiły odpowiednio 30 i 36%. Reakcje usunięcia grupy 2,4-dimetoksybenzylowej przebiegały z wydajnościami 58 - 67%. W przypadku zastosowania tej metodologii proces oczyszczania odbezpieczonych związków **309b,g** był skomplikowany, ze względu na produktów ubocznych o podobnej polarności. Ponadto wydajność całkowita syntezy kwasu **307** jest stosunkowo niska (12%). Z tych powodów pomimo większej liczby etapów, metoda z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym jest dogodniejszą metodą syntezy tej grupy peptydomimetyków.

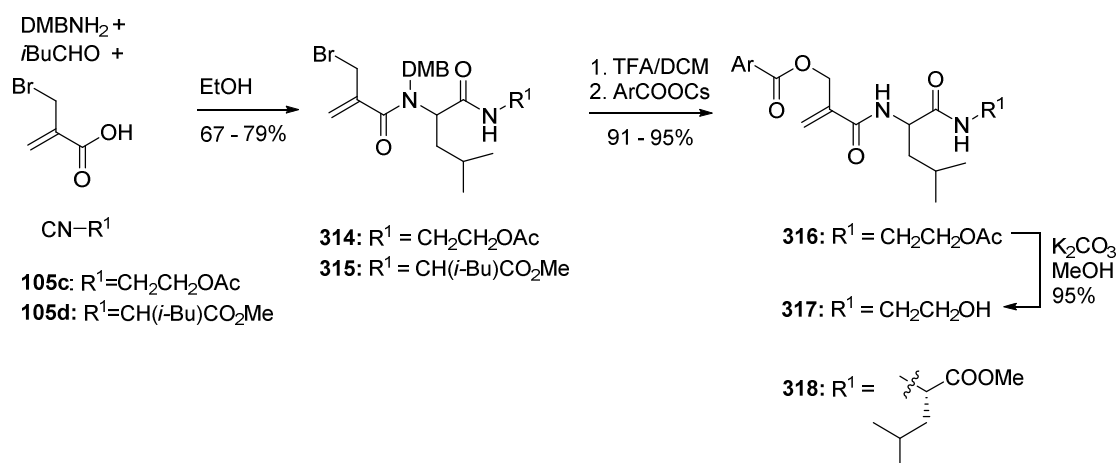
Stosując opisaną powyżej metodologię otrzymano szereg peptydomimetyków z alifatycznymi i aromatycznymi łańcuchami bocznymi R¹ (Schemat 49). Cel syntetyczny

¹³¹ Greene, T. W, Wuts, P. G. M., "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley-Interscience, New York, 1999

został zrealizowany, dlatego nie podjęto się prób dalszej optymalizacji etapu reakcji Ugiego. Zaletą opracowanej metody była możliwość syntezy inhibitorów zawierających fragment peptydowy o różnorodnej budowie, również z fragmentami nienaturalnych aminokwasów. Z tego powodu, metoda ta była konkurencyjna dla syntezy metodami klasycznego sprzęgania.

5.4.2. Synteza peptydomimetyków z różnymi fragmentami P₂

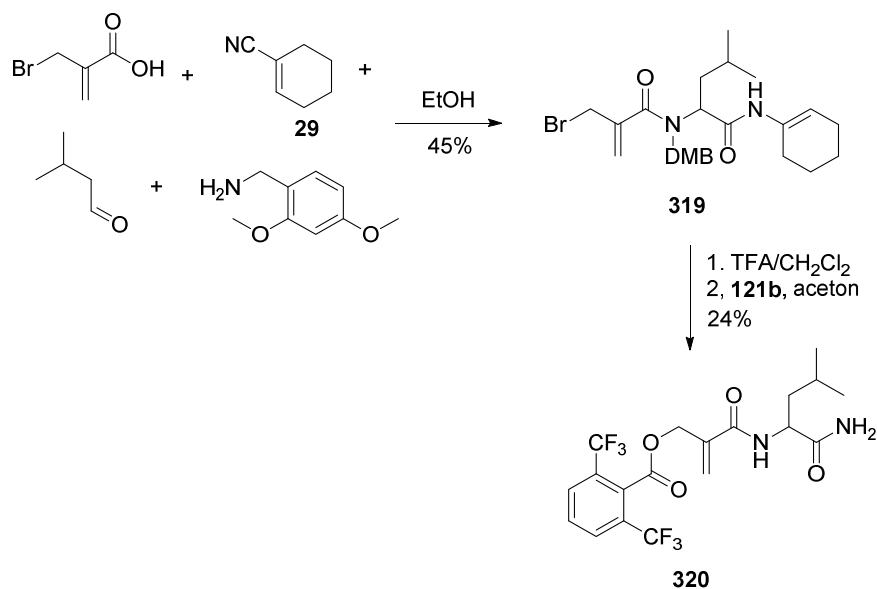
Synteza peptydomimetyków z różnymi fragmentami w pozycji P₂ wymagała dodatkowo otrzymania różnych izocyjanków. Wykonano syntezę izocyjanków **105c**, **105d** oraz modyfikowalnego izocyjanku **29**, który posłużył do uzyskania peptydomimetyku bez fragmentu P₂. Izocyjanki **105c,d** oraz **29** zostały otrzymane zgodnie z procedurami literaturowymi.^{36,44} Zastosowanie octanu 2-izocyjanoetylu (**105c**) prowadziło do otrzymania peptydomimetyku **314**, z fragmentem etanolominy z acylowaną grupą hydroksylową.



Schemat 51. Synteza związków z różnym fragmentem P₂

Wykonano reakcję Ugiego z izocyjankiem **105c**, kwasem 2-(bromometylo)akrylowym, aldehydem izowalerianowym oraz 2,4-dimetoksybenzyloaminą, otrzymując peptydomimetyk **314** z wydajnością 67%. Podobnie jak w poprzedniej części badań, reakcję usunięcia grupy 2,4-dimetoksybenzylowej i reakcje podstawienia wykonano bez oczyszczania chromatograficznego produktu pośredniego. W wyniku tych przemian otrzymano związek **316**, z wydajnością 91%. Opracowano również metodę chemoselektywnej hydrolizy grupy estru kwasu octowego. Aby zminimalizować ryzyko hydrolizy drugiej grupy estrowej, reakcję tę przeprowadzono 2N roztworem węglanu potasu w metanolu w temperaturze 0 °C, co prowadziło do produktu **317** z wydajnością 97%.

Z estru metylowego *L*-leucyny otrzymano również chiralny izocyjanek **105d**, który wykorzystano w uprzednio opracowanej metodzie syntezy β -acyloksymetakrylanów. Reakcja Ugięgo z tym izocjankiem prowadziła do otrzymania peptydomimetyku **315** z wydajnością 79%. Następnie, związek ten poddano reakcji odbezpieczenia i podstawienia otrzymując w ten sposób peptydomimetyk **318** z wydajnością 95% (Schemat 51).



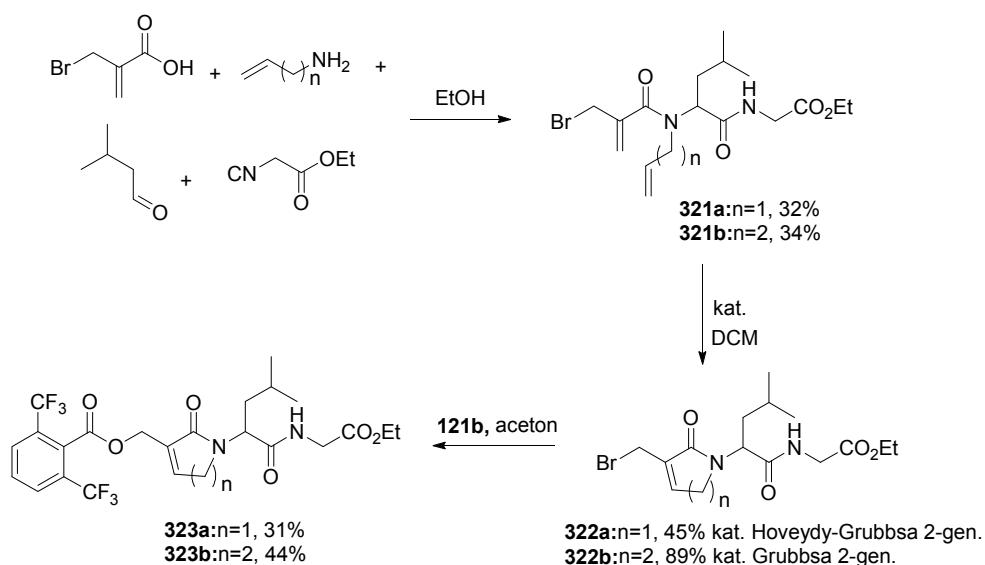
Schemat 52. Synteza peptydomimetyków bez fragmentu P₂

Zastosowanie izocyjanu **29** umożliwił syntezę peptydomimetyków bez fragmentu P₂. Reakcja Ugięgo z izocyjanem **29** prowadziła do związku **319** z wydajnością 45%. Grupę cykloheksylidenową usuwano razem z grupą 2,4-dimetoksybenzylową reakcją z kwasem trifluorooctowym (Schemat 52). Otrzymany produkt pośredni od razu był użyty do reakcji z solą ceszową kwasu 2,6-bis(trifluorometylo)benzoowego, co prowadziło to do otrzymania związku **320** z wydajnością 24% dla obu etapów.

5.4.3. Badania nad syntezą cyklicznych peptydomimetyków - zmiana fragmentu P₀

W ostatnim etapie badań nad syntezą biblioteki peptydomimetyków z fragmentem β -acyloksymetakrylowym, zaproponowano cykliczne analogi otrzymanego wcześniej peptydomimetyku **123b**. Synteza cyklicznych analogów związków biologicznie aktywnych jest często stosowanym podejściem w badaniach zależności aktywności od struktury.²⁹ Związki cykliczne są związkami bardziej sztywnymi i zmiana ich konformacji jest ograniczona. Może to pozytywnie wpływać na aktywność biologiczną. Zaproponowano

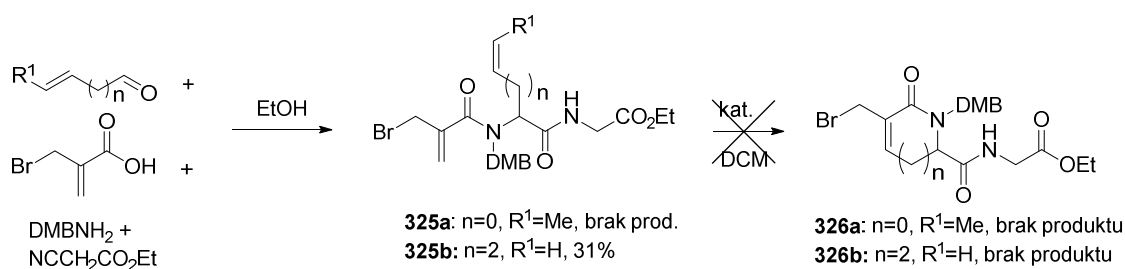
dwa nowe cykliczne peptydomimetyki o strukturze ogólnej **323** (Schemat 53). Kluczowym etapem tej syntezy była reakcja metatezy olefin odpowiednich peptydomimetyków zawierających wiązanie podwójne (**321a,b**).



Schemat 53. Synteza cyklicznych peptydomimetyków do syntezy cyklicznych peptydomimetyków

W pierwszym etapie przeprowadzono reakcję Ugiego, w której komponentem aminowym były: 3-butenyloamina oraz alliloamina, otrzymując odpowiednie peptydomimetyki **321a,b**, zawierające w swojej strukturze wiązania podwójne, z wydajnościami odpowiednio 32% i 34%. Tak otrzymane związki wykorzystano do reakcji metatezy, w której jako katalizatorów użyto katalizatora Grubbsa drugiej generacji lub katalizatora Hoveydy-Grubbsa drugiej generacji. Do cyklizacji związku **321a** zastosowano początkowo reakcję metatezy w temperaturze pokojowej z katalizatorem Grubbsa drugiej generacji. Zaobserwowano jednak tworzenie się jedynie śladowych ilości związku **322a**. Zastosowano więc reakcję w temperaturze wrzenia, jednak katalizator Grubbsa drugiej generacji szybko rozkładał się w warunkach reakcji. Z tego powodu zastosowano trwalszy katalizator Hoveydy-Grubbsa drugiej generacji. W tych warunkach otrzymano laktam **322a** z wydajnością 45%. Cyklizacja związku **321b** zachodziła w łagodniejszych warunkach. W tym przypadku, związek **322b** otrzymano stosując katalizator Grubbsa drugiej generacji w temperaturze pokojowej z wydajnością 89%. W następnym etapie cykliczne peptydomimetyki **322a,b** zostały poddane reakcji podstawienia solą cezową **121b**, otrzymując związki **323a,b** z wydajnościami 31 i 41% (Schemat 53).

Podjęto również próby syntezy związków cyklicznych o strukturze **326** (Schemat 54). W tym celu przeprowadzono reakcję Ugiego z aldehydami zawierającymi wiązanie podwójne: krotonowym oraz 4-pentenowym (Schemat 54). Zastosowanie aldehydu 3-butenowego nie było możliwe, ponieważ szybko izomeryzował on w warunkach reakcji do termodynamicznie trwalszego aldehydu krotonowego. W reakcji Ugiego z aldehydem krotonowym nie zaobserwowano tworzenia się oczekiwanego produktu **325a**. Było to prawdopodobnie spowodowane dużą reaktywnością tego aldehydu. Reakcja Ugiego zachodziła natomiast z aldehydem 4-pentenowym. W wyniku tej reakcji otrzymano peptydomimetyk **325b** z wydajnością 31%. Podjęto próby zamknięcia pierścienia w związku **325b** z wykorzystaniem reakcji metatezy Niestety, pomimo zastosowania różnych katalizatorów (Grubbsa pierwszej i drugiej generacji, Hoveydy-Grubbsa drugiej generacji), reakcja metatezy nie prowadziła do oczekiwanego produktu **326b**.



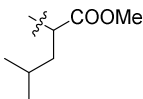
Schemat 54. Próby syntezy związków cyklicznych o strukturze **326**

Pomimo niepowodzenia syntezy związków **326a,b**, reakcja metatezy olefin umożliwiła syntezę peptydomimetyków cyklicznych z fragmentem β -acyloksymetakrylamidu, które zostały oddane do badań biologicznych.

5.4.4. Wyniki badań biologicznych dla otrzymanej biblioteki związków

Otrzymane związki zostały przebadane w testach enzymatycznych jak również w modelach komórkowych raka trzustki (Panc02). W Tabeli 9 przedstawiono wyniki tych badań dla otrzymanych peptydomimetyków. Wyznaczone wartości IC_{50} dla związków **309a-f**, zawierających grupy alkilowe w pozycji P_1 były zbliżone i wynosiły więcej niż 20 μM . W modelu komórkowym dla tych związków, wartości LD_{50} były wyższe niż dla związku **123b**, za wyjątkiem związku **309b**, którego efekt cytoksyczny był silniejszy niż dla pozostałych peptydomimetyków (l.p. 2).

Tabela 9. Badania zależności aktywności od struktury β -acyloksymetakryloamidów.

L.p.	Związek	P ₁ ^a	P ₂ ^b	IC ₅₀ [μ M]	LD ₅₀ [μ M] (Panc02)
1	309a	Et	-CH ₂ CO ₂ Et	21,0	8,0
2	309b	<i>i</i> -Pr	-CH ₂ CO ₂ Et	25,2	2,8
3	309c	<i>n</i> -Pr	-CH ₂ CO ₂ Et	24,8	8,0
4	309d	<i>n</i> -Bu	-CH ₂ CO ₂ Et	24,4	8,2
5	309e	<i>n</i> -Heptyl	-CH ₂ CO ₂ Et	23,6	>25
6	309f	<i>n</i> -Oktyl	-CH ₂ CO ₂ Et	25,7	>25
7	309g	Ph	-CH ₂ CO ₂ Et	9,2	6,7
8	309h	2-naftył	-CH ₂ CO ₂ Et	3,5	>25
9	309i	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	-CH ₂ CO ₂ Et	12,0	>25
10	309j	<i>p</i> -CHOC ₆ H ₄	-CH ₂ CO ₂ Et	4,4	6,2
11	316	<i>i</i> -Bu-	CH ₂ CH ₂ OAc	9,6	5,2
12	317	<i>i</i> -Bu-	CH ₂ CH ₂ OH	9,9	4,5
13	318	<i>i</i> -Bu-		>25	>25
14	320	<i>i</i> -Bu-	H	10,4	4,2
15	323a^d	<i>i</i> -Bu-	-CH ₂ CO ₂ Et	~20 ^c	n/o
16	323b^d	<i>i</i> -Bu-	-CH ₂ CO ₂ Et	~15 ^c	n/o
17	(R)-123b	<i>i</i> -Bu	-CH ₂ CO ₂ Et	3,5	n/o
18	(S)-123b	<i>i</i> -Bu	-CH ₂ CO ₂ Et	2,8	n/o
17	123b	<i>i</i> -Bu	-CH ₂ CO ₂ Et	3,3	3,8

^aZmiana podstawnika poprzez zmianę aldehydu; ^bZmiana podstawnika poprzez zmianę izocyjanku; ^cDokładne IC₅₀ nie zostało oznaczone; ^dZmiana fragmentu P₀; n/o – nie oznaczono

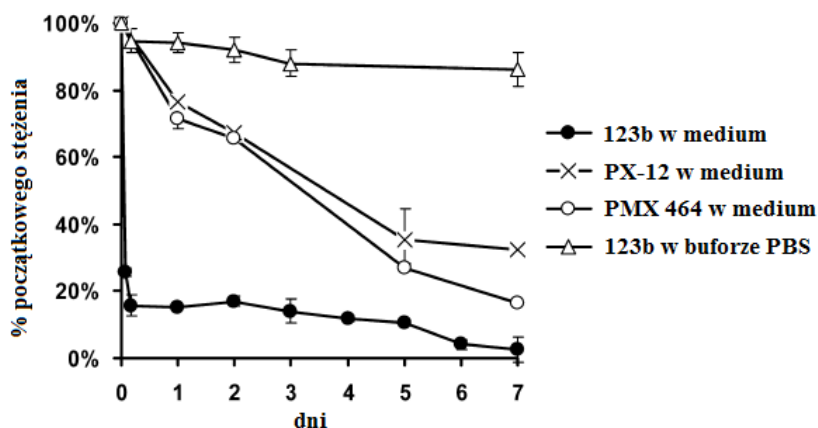
Niższe wartości IC₅₀ posiadały związki z aromatycznym łańcuchem bocznym (l.p. 7-10). Dla związków zawierających grupę 2-naftyłową (**309h**) oraz *p*-fluorofenyłową (**309i**) LD₅₀ było wysokie, pomimo niskiego IC₅₀ na izolowanym układzie enzymatycznym (l.p. 8,9). Dla różnych fragmentów P₂ (l.p. 11-14), wartości IC₅₀ były zbliżone, za wyjątkiem związku **318**, który nie był aktywny w badanych stężeniach. Gdy związek nie zawierał

fragmentu P₂ (l.p. 14), IC₅₀ było nieznacznie większe niż związku **123b**, przy jednoczesnym zachowaniu niskiej wartości LD₅₀ w modelu komórkowym. Wartości IC₅₀ dla cyklicznych peptydomimetyków **323a,b** były wysokie w porównaniu do związku **123b**. Enancjomery (*S*)-**123b** i (*R*)-**123b** wykazywały różną aktywność na izolowanym układzie Trx-TrxR (l.p.17,18)

Otrzymanie szeregu związków, dla których wyniki przedstawiono w Tabeli 9 umożliwiły wyselekcjonowanie najbardziej aktywnych peptydomimetyków. W modelu enzymatycznym, na izolowanym układzie tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny, najbardziej aktywne były związki **309j**, **309h** oraz otrzymany wcześniej peptydomimetyk **123b**.

Pomimo bardzo dużej aktywności na izolowanym enzymie, związek **309h** nie wykazywał efektu cytotoksycznego/cytostatycznego w modelu komórkowym. Może to świadczyć o tym, iż związek dobrze dokuje się do miejsca aktywnego w enzymie jednak jego dystrybucja w komórce jest ograniczona z racji dużej lipofilowości. Związek **309b** wykazuje odwrotny profil aktywności. Związek ten jest bardzo cytotoksyczny jednak wykazuje słabszą inhibicję Trx-TrxR niż pozostałe inhibitory. Oznacza to, że cytotoksyczne działanie związku może być spowodowane oddziaływaniem z innymi enzymami. Związki posiadające długie łańcuchy węglowodorowe (**309e,f**) były najmniej aktywne, najprawdopodobniej z powodu zbyt dużej lipofilowości, co mogło ograniczać ich rozpuszczalność w wodzie. Zbyt duża lipofilowość może być również powodem niskiej aktywności związku **318**. Badania wykazały również, że cykliczne peptydomimetyki **323a,b** miały niższą aktywność niż związek **123b**. Prawdopodobnie wiązanie podwójne w tego rodzaju związkach jest zbyt mało reaktywne. Badania nad aktywnością poszczególnych enancjomerów inhibitora **123b** umożliwiły dodatkowo identyfikację bardziej aktywnego enancjomeru: (*S*)-**123b**.

Spośród badanych związków największą aktywnością zarówno wobec izolowanego układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny jak i wobec modeli komórkowych wykazywał związek **123b**. Dla tego związku przeprowadzono dodatkowo badania jego stabilności w buforze oraz medium, w którym hodowane były komórki do badań. Peptydomimetyk **123b** inkubowany był w buforze PBS pH = 7,4 oraz medium hodowlanym przez 7 dni w temperaturze 37 °C. Dla celów porównawczych takie badania przeprowadzono również dla związków PMX-464 oraz PX-12. Badania te pokazały, że peptydomimetyk **123b** był stabilny w buforze przez 7 dni.



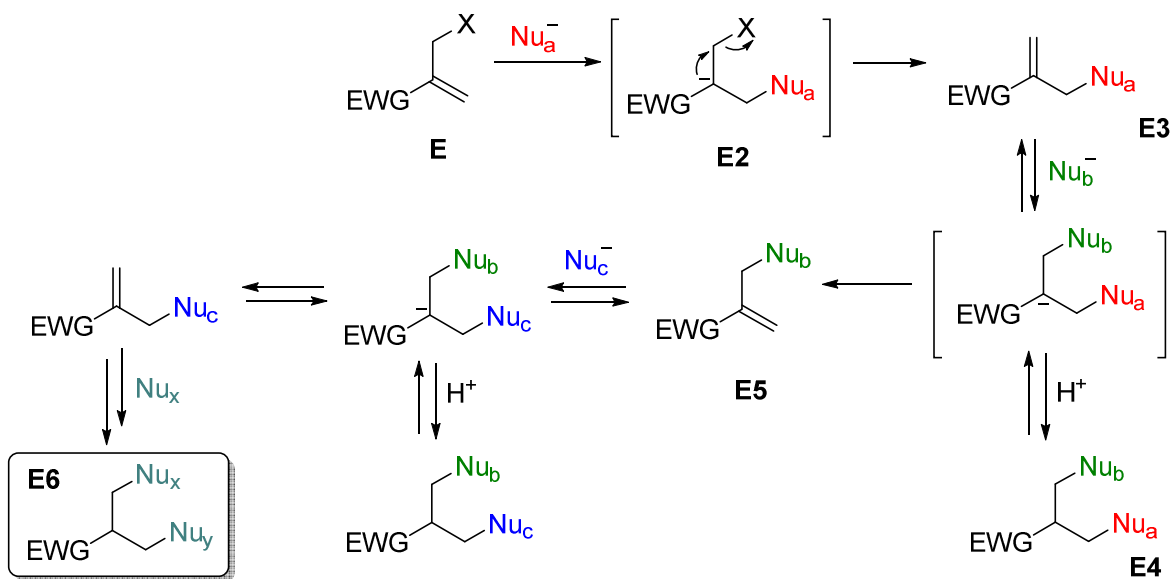
Rycina 6. Badania trwałości w medium biologicznym i buforze PBS (pH = 7.4, 0.01M).

W medium hodowlanym stężenie związku **123b** gwałtownie spada w porównaniu do PX-12 i PMX464. Pomimo tego spadku stężenia, związek nadal wykazuje efekt cytotoksyczny porównywalny do PX-12 (Tabela 5). Na tym etapie badań nie jest możliwe wyjaśnienie, czy efekt biologiczny wywołany jest przez pozostałą w medium ilość związku w swojej początkowej postaci, czy może jest to spowodowane aktywnością biologiczną adduktów utworzonych ze związku **123b**.

Wnikliwa analiza literaturowa sugeruje jednak, że jednym z możliwych wyjaśnień tego zjawiska jest koncepcja opisana w 1979 przez Lawtona i Mitra. Opisali oni ogólną koncepcję interakcji związków o strukturze **E**, z białkami.¹³² Autorzy koncepcji postulują, że przedstawione na Rycinie 7 związki o strukturze **E** mogą odwracalnie oddziaływać z nukleofilowymi resztami aminokwasów w białkach. Nukleofil (grupa NH, OH pochodząca z białka) może bowiem ulegać addycji do wiązania podwójnego, powodując jednocześnie eliminację grupy opuszczającej X. Utworzony w ten sposób drugi akceptor Michaela w produkcji pośrednim **E3**, może wstępować w reakcję z innym nukleofilem. W wyniku takiej reakcji mogą powstać dwa produkty: związek **E4**, lub związek **E5**, wytworzony w wyniku reakcji retroaddycji Michaela. Związek **E5**, podobnie jak związek **E3** może reagować z kolejnym nukleofilem Nu_c, w wyniku czego może zajść kolejna retroaddycja Michaela. Autorzy postulują, że proces może się powtarzać aż do momentu utworzenia relatywnie trwałego związku **E6**, w którym Nu_x oraz Nu_y nie są zbyt dobrymi grupami opuszczającymi.¹³² Zgodnie z tym mechanizmem, możliwe jest więc, że związki o strukturze **E** mogą „przemieszczać” się po nukleofilowych łańcuchach bocznych białek do momentu utworzenia trwałego związku **E6**. Wyniki badań przeprowadzonych przez

¹³² a)Mitra, S.; Lawton, R. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, 3097 b)Liberatore, F. A., Comeau, R. D., McKearin, J. M., Pearson, D. A., Belonfa III, B. Q., Brocchini, S. J., Kath, J., Phillips, T., Oswell, K., Lawton, R. G, *Bioconjugate Chem.*, **1990**, *1*, 36

Liberatore'a na przeciwciałach wskazują, że takimi trwałymi związkami są tioetery utworzone z reszt cysteiny.



Rycina 7: Koncepcja „równowagowego transferu reagentów sieciujących” (ang. Equilibrium Transfer Alkylating Cross-Link reagents, ETAC)

Zaprezentowana powyżej teoria opisana została dla związków w których grupą opuszczającą były sulfoniany i pochodne anionów fenolanowych ($X = -SO_2Ph$, $4-NO_2PhO^-$). Może ona jednak wyjaśniać zachowanie związku **123b** medium hodowlanym. Medium zawiera aminokwasy oraz białka, które mogą łączyć się z peptydomimetykiem **123b**. Następnie może być on przenoszony na inne grupy nukleofilowe w innych białkach. Ostatecznie może być on przeniesiony na tioredoksynę, która posiada dwie reszty cysteiny w unikalnie bliskiej odległości. Przeniesienie związku **123b** na te cysteiny jest termodynamicznie korzystne i proces staje się nieodwracalny. Można zatem przypuszczać, że związki te działają według podobnego mechanizmu.

5.5. Badania nad opracowaniem reakcji Ugiego katalizowanej enzymami

Badania nad syntezą nowych inhibitorów układu tioredoksyny przeprowadzono z wykorzystaniem kombinacji reakcji multikomponentowych oraz metod enzymatycznych. Dzięki tej kombinacji możliwa była efektywna synteza nowych peptydomimetyków z fragmentem elektrofilowym zarówno w formie racemicznej jak formie enancjomerycznie wzbogaconej. Pokazano tym samym, że zastosowanie chemoenzymatycznych metod w połączeniu z reakcjami multikomponentowymi daje bardzo wygodne i użyteczne narzędzie w chemii organicznej.

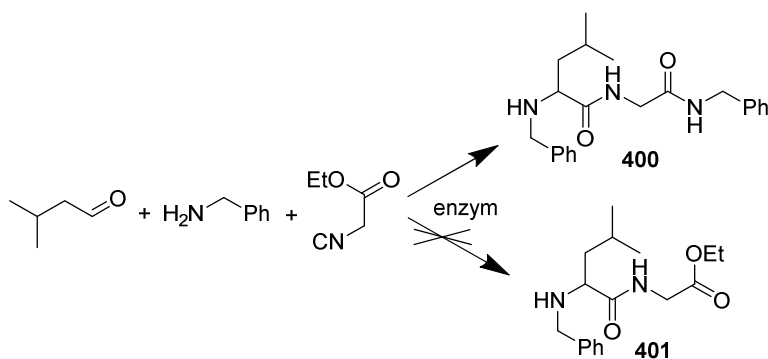
Pomimo wielu przykładów zastosowania reakcji Ugiego w kombinacji z metodami enzymatycznymi, przybliżonych w części literaturowej, nie opisano do tej pory reakcji Ugiego katalizowanej enzymami. Podczas realizacji opisanych powyżej badań nad chemoenzymatyczną metodologią syntezy nowych inhibitorów tioredoksyny, przeprowadzono badania modelowe nad opracowaniem nowego wariantu reakcji Ugiego katalizowanej lipazami.

Jak pokazano w części literaturowej, lipazy często wykazują aktywności różne od tych, właściwych dla swojej naturalnej funkcji. Możliwe, że takie aktywności wynikają z faktu, że enzym posiada szereg grup bocznych aminokwasów mogących działać jako czynniki kwasowe, zasadowe, nukleofilowe etc. Właściwości chemiczne tych grup wykorzystywane w naturalnych reakcjach mogą czasem jednak być wykorzystane do zupełnie nowych reakcji katalizowanych enzymatycznie. W rozdziale 2.1.4. przedstawiono katalityczne, trójkomponentowe modyfikacje reakcji Ugiego, w których katalizatorami były fosforoorganiczne kwasy Brønsteda. Lipazy w swoim centrum aktywnym również posiadają kwasowe grupy w łańcuchach bocznych aminokwasów, takie jak np. kwas asparaginowy. Możliwe jest więc, że grupa kwasowa zawarta w enzymie będzie również katalizować trójkomponentową reakcję Ugiego według mechanizmu podobnego do mechanizmu przedstawionego dla kwasów fosforoorganicznych. (Schemat 14). W celu potwierdzenia tej tezy przeprowadzono w ramach niniejszej pracy badania modelowe nad katalizowaną enzymatycznie, trójkomponentową reakcją Ugiego.

5.5.1. Badania modelowe nad opracowaniem reakcji Ugiego katalizowanej enzymami

Jako punkt wyjścia do nowej reakcji przyjęto katalityczną modyfikację reakcji Ugiego opracowaną przez Lista.⁴⁶ Przeprowadzono podobny eksperyment przeprowadzając reakcję

aldehydu izowalerianowego, benzyloaminy oraz izocyjanoctanu etylu w toluenie. Zamiast odpowiedniego kwasu fosfinowego do reakcji dodano różne lipazy dostępne komercyjnie.¹³³ Dla większości enzymów reakcja nie zachodziła, co można było stwierdzić po intensywnym zapachu izocyjanooctanu etylu. Zapach izocyjanu nie był jednak wyczuwalny w mieszaninie reakcyjnej zawierającej immobilizowaną lipazę z *Candida antarctica* (Novozym 435) oraz formę natywną tego enzymu.



Schemat 55. Trójkomponentowa reakcja Ugiego katalizowana lipazami

Pomimo całkowitej konwersji izocyjanu nie obserwowano jednak powstawania związku **401**, który tworzył się w reakcji kwasem fenylofosfinowy opisanej przez Lista. Produkt główny zidentyfikowano jako aminoamid o strukturze **400**. Związek ten tworzył się z wydajnością 43%. Ponieważ w reakcji stosowano równomolowe ilości poszczególnych substratów (zgodnie ze stechiometrią trójkomponentowej reakcji Ugiego), powtórzono reakcję stosując 2 ekwiwalenty aminy w stosunku do pozostałych reagentów. Wydajność tak zmodyfikowanej reakcji wzrosła do 75% po 24 godzinach reakcji.

Znając strukturę produktu było możliwe określenie czy powstaje on również w obecności innych enzymów. Spośród badanych enzymów, zidentyfikowano pięć lipaz katalizujących tę reakcję. Reakcję katalizowały: lipazy z *Candida antarctica* (immobilizowana i natywna), lipaza z *Candida cylindracea* oraz Amano Lipaza PS (Tabela 10). Produkt **400** tworzył się z największą wydajnością w obecności Novozymu 435. (Tabela 10, l.p.1). Kluczowym było wyjaśnienie czy na reakcję ma sama obecność białka w mieszaninie reakcyjnej, czy za katalizowanie reakcji odpowiedzialna jest aktywność enzymu. W tym celu przeprowadzono reakcję z dezaktywowanym enzymem CAL-B. Enzym dezaktywowano poprzez ogrzewanie go w temperaturze wrzenia toluenu przez 16 godzin. Następnie przeprowadzono reakcję z tak dezaktywowanym enzymem, jednak nie zaobserwowano tworzenia się związku **400** (Tabela 10, l.p. 6).

¹³³ Listę wszystkich enzymów stosowanych w badaniach przesiewowych umieszczono w części eksperymentalnej.

Tabela 10. Wpływ enzymów na trójkomponentową reakcję Ugiego

L.p.	Enzym	Wyd. [%] ^a
1	Novozym 435	75
2	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	41
3	“ <i>Candida antarctica</i> lipase acrylic resin”	41
4	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	15
5	Amano lipaza PS	19
6	Lipaza z <i>Candida antarctica</i> (dezaktywowana)	0
7	Brak enzymu	0

^aWydajność izolowanego produktu; Warunki reakcji: amina (2 równ.), aldehyd (1 równ.), izocyjanek (1 równ.), c = 0.02 M), , enzym (20%_{wag})

Fakt, że reakcja nie była katalizowana przez zdezaktywowany enzym, potwierdza, że to aktywna forma enzymu jest odpowiedzialna za przebieg reakcji. W reakcji bez enzymu nie zaobserwowano tworzenia się związku **400** nawet po 7 dniach prowadzenia reakcji (Tabela 10, l.p. 7).

Tabela 11. Wpływ rozpuszczalnika na przebieg reakcji

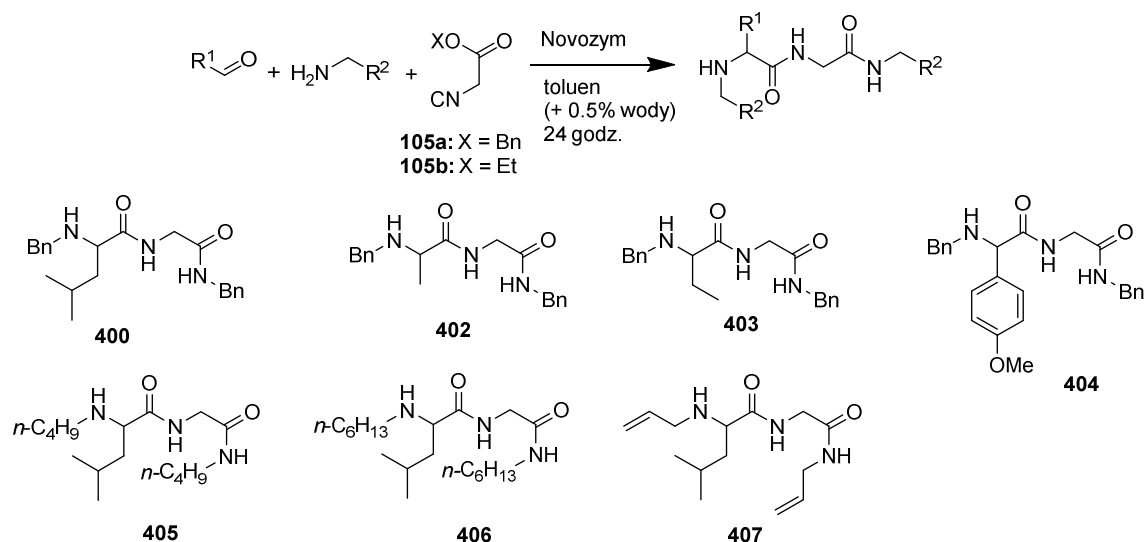
L.p.	Rozpuszczalnik	Wyd. [%]
1	Toluen	75
2	Chloroform	64
3	Woda	45
4	Etanol 96%	0
5	Tetrahydrofuran	0

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu rozpuszczalnika na przebieg katalitycznej reakcji Ugiego z enzymami (Tabela 11). Oprócz toluenu, który był najlepszym rozpuszczalnikiem dla tej reakcji, związek **400** tworzył się w reakcji w chloroformie (Tabela 11, l.p. 2) i, co ważne, w wodzie (Tabela 11, l.p. 3). Katalityczna reakcja Ugiego opracowana poprzednio przez Lista nie może być przeprowadzona w wodzie, ponieważ obecność kwasu fenylofosfonowego, jako katalizatora, może powodować rozkład izocyjanu. Oczekiwany produkt nie jest otrzymywany w reakcji w etanolu (Tabela 11, l.p. 4), prawdopodobnie ze względu na denaturację enzymu, co dodatkowo potwierdza enzymatyczny charakter reakcji. Również tetrahydrofuran nie jest odpowiednim rozpuszczalnikiem do tej reakcji, ponieważ prawdopodobnie powoduje on denaturację enzymu (Tabela 11, l.p. 5).

Wykonanie powyższych badań umożliwiło dobór optymalnych warunków prowadzenia opracowanej reakcji. W dalszych badaniach zastosowano tę metodologię do syntezy α -aminoamidów.

5.5.2. Synteza α -aminoamidów z wykorzystaniem reakcji Ugiego katalizowanej enzymami

Wykonano szereg enzymatycznych reakcji stosując różne aminy - benzyloaminę, alliloaminę, *n*-butyloaminę, *n*-heksyloaminę oraz aldehydy - octowy, propionowy, 4-metoksybenzoowy oraz izowalerianowy. W wyniku tych reakcji otrzymano szereg α -aminoamidów **402** – **407** w jednym etapie, w reakcji w toluenie (Schemat 56). Reakcję wykonano dodatkowo dla izocyjanooctanu benzylu, otrzymując związek **400** z wydajnością 78%.



Schemat 56. Synteza aminoamidów z wykorzystaniem katalitycznej reakcji Ugiego

Na tym etapie badań zaobserwowano, że dla niektórych reakcji kluczowa jest obecność niewielkiej ilości wody (0.5%). W Tabeli 12 przedstawiono wydajności reakcji Ugiego katalizowanej enzymami. Wydajność reakcji bez dodatku wody była wyraźnie niższa w przypadku reakcji tworzenia się związków **400** (dla reakcji z izocyjanooctanem etylu) oraz **405** (Tabela 12, l.p. 1,6). Związek **400** nie tworzył się wcale w przypadku dodatku wody do reakcji z izocyjanooctanem benzylu (Tabela 12, l.p. 2). Obecność niewielkiej ilości podwyższała natomiast wydajności reakcji tworzenia się związków **402**, **403**, **406** oraz **407** (Tabela 12, l.p. 3,4,7,8). W przypadku reakcji z aldehydem 4-metoksybenzoowym reakcja bez dodatku wody nie prowadzi do otrzymania związku **404**.

Jak wynika z Tabeli 12, wpływ wody jest znaczący dla niektórych reakcji. W przypadku reakcji z izocyjanooctanem benzylu obecność wody całkowicie hamuje reakcję Ugiego. Z drugiej strony, obecność wody jest kluczowa dla tworzenia się związku **404**. Dla pozostałych przypadków wpływ wody nie jest jednoznaczny. Wynika to prawdopodobnie ze złożoności mechanizmu reakcji. Obecność wody może bowiem wpływać niezależnie na etap tworzenia się iminy lub na jeden z etapów związanych z katalizą enzymatyczną. Ponieważ lipazy są enzymami naturalnie działającymi na granicy faz (olej-woda), obecność wody ma duży wpływ na ich aktywność.⁵⁰ Dokładne określenie tego wpływu nie było jednak przedmiotem badań na tym etapie.

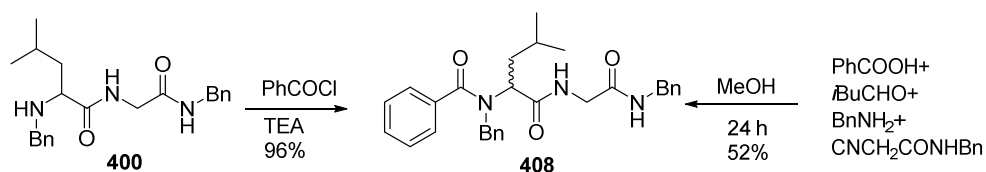
Tabela 12. Wpływ dodatku wody na wydajność katalitycznej reakcji Ugiego.

L.p.	Związek	Izocyjanek	Wydajność [%]	
			bez dodatku wody	z dodatkiem wody ^a
1	400	105b	75	29
2	400	105a	78	0
3	402	105b	2	63
4	403	105b	76	87
5	404	105b	0	43
6	405	105b	10	0
7	406	105b	12	44
8	407	105b	21	49

^aDodatek wody w ilości 0,5%_{obj}

Dla otrzymanych związków określono skręcalność optyczną w celu określenia stereoselektywności reakcji. Badania wykazały jednak, że dla wszystkich związków skręcalność właściwa wynosiła 0. W celu potwierdzenia, że w reakcji otrzymywana jest mieszanina racemiczna, dodatkowo wykonano badania z wykorzystaniem HPLC. Ponieważ jednak rozdział enancjomerów aminy **400** nie był możliwy z użyciem HPLC, z wykorzystaniem dostępnych kolumn z chiralnym wypełnieniem, wykonano syntezę związku **408** (Schemat 57). Racemiczny związek **400** otrzymano w reakcji Ugiego z kwasem benzoowym, aldehydem izowalerianowym, benzyloaminą i izocyjanooctanem benzylu, z wydajnością 52%. W przypadku tego związku było możliwe wyznaczenie

namiaru enancjomernego za pomocą HPLC. Następnie wykonano reakcję otrzymanej w reakcji enzymatycznej aminy **400** z chlorkiem benzoilu. Związek **408** otrzymano tą metodą z wydajnością 96%. Analiza przy pomocy HPLC obu związków wykazała, że w reakcji enzymatycznej powstaje mieszanina racemiczna. Ta obserwacja jest niestety zgodna z danymi literaturowymi, z których wynika, że promiskuitywne reakcje enzymatyczne nie są na ogół stereoselektywne.



Schemat 57. Synteza związku **408**

Podsumowując badania w tej części, opracowano nową, enzymatycznie katalizowaną reakcję multikomponentową z izocyjnakami. Opracowana reakcja prowadzi do powstania aminoamidów z prostych reagentów. W przeciwieństwie do uprzednio opracowanej katalitycznej trójkomponentowej reakcji Ugiego, zaprezentowana reakcja enzymatyczna może być przeprowadzona w temperaturze pokojowej i możliwe jest zastosowanie wody jako rozpuszczalnika. Oprócz znaczenia praktycznego, opracowana reakcja ilustruje możliwości jakie dają promiskuitywne aktywności lipaz, co znacznie rozszerza aplikacje tych łatwo dostępnych enzymów. Wyniki badań nad tą reakcją zostały opublikowane w *Organic Letters* w 2013 roku.

6. Wnioski

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki badań nad syntezą nowych inhibitorów układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny z zastosowaniem reakcji multikomponentowej Ugiego. Otrzymano szereg peptydomimetyków z różnymi fragmentami elektrofilowymi, zaprojektowanymi w oparciu o budowę miejsca aktywnego tioredoksyny i reduktazy tioredoksyny. Synteza tych peptydomimetyków umożliwiła przeprowadzenie badań biologicznych i identyfikację peptydomimetyków o największej aktywności względem układu tioredoksyna – reduktazy tioredoksyny. Wynikiem tych badań było opracowanie syntezy nowej grupy peptydomimetyków z fragmentem β -acyloksymetakryloamidów. Związki z taką grupą nie były wcześniej otrzymane. Peptydomimetyki posiadające taki fragment nie tylko bardzo silnie działały hamująco na izolowany układ tioredoksyny ale również wykazywały selektywne działanie cytotoksyczne na komórkach rakowych.

Zgodnie z wymaganiami nowoczesnej chemii medycznej opracowywano metodę syntezy nieracemicznych peptydomimetyków z aktywnymi biologicznie fragmentem elektrofilowym. W metodzie tej zaproponowano i wykazano przydatność nowego pomocnika chiralnego – α -2,4-(dimetoksyfenylo)etyloaminy. Ponieważ synteza chiralnej, nieracemicznej aminy nie była wcześniej opisana, opracowano nową, chemoenzymatyczną metodę syntezy optycznie czystych enancjomerów α -2,4-(dimetoksy)fenyloetyloaminy. W metodzie tej opracowano warunki enzymatycznego rozdziału kinetycznego racemicznej aminy w reakcji acylowania metoksyoctanem metylu. Opracowany rozdział kinetyczny wykorzystuje szeroko dostępny enzym – Novozym 435, dzięki czemu reakcja może być przeprowadzona w skali preparatywnej. Wykazano, że otrzymany pomocnik chiralny może być zastosowany w reakcji Ugiego do syntezy peptydomimetyków, ponieważ jest on usuwany w łagodnych warunkach ze struktury produktu. Dzięki temu, otrzymana amina może być szeroko stosowana jako „chiralny ekwiwalent amoniaku” w reakcji Ugiego.

Wykonano również syntezę biblioteki peptydomimetyków z fragmentem β -acyloksymetakrylowym w celu optymalizacji struktury inhibitora układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny. Synteza tych związków umożliwiła wykonanie badań zależności aktywności od struktury (SAR). Wiele, spośród otrzymanych związków było efektywnymi inhibitorami układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny. Ich aktywność biologiczna była porównywalna do aktywności związku PX-12, który jest pierwszym inhibitorem tioredoksyny dopuszczonym do badań klinicznych. Sprawia to, że grupa

β -acyloksometakrylowa jest niezwykle interesującym farmakoforem. Wynikiem tych badań było wyselekcjonowanie najbardziej aktywnego inhibitora **123b**.

Przedmiotem badań w niniejszej pracy było opracowanie przede wszystkim nowych metod syntezy pozwalających na otrzymanie nowych związków. Podczas tych badań opracowano nową reakcję multikomponentową z izocyjankami. Wykorzystanie promiskuityzmu lipaz umożliwiło przeprowadzenie nowej trójkomponentowej kondensacji aldehydu, aminy oraz izocyjanku, prowadzącej do α -aminoamidów w jednym etapie syntezy. Wykazano, że szeroko dostępny enzym, lipaza z *Candida antarctica*, katalizuje nową reakcję kondensacji, dając produkty z dobrymi wydajnościami, zarówno w rozpuszczalnikach organicznych jak i w wodzie. Pomimo wielu opisanych przykładów reakcji Ugięgo wykonywanej wraz z reakcjami enzymatycznymi, opracowana w pracy reakcja jest pierwszym przykładem bezpośrednio katalizowanej enzymami reakcji Ugięgo. Opracowana reakcja nie tylko jest wygodną, jednaetapową, metodą syntezy α -aminoamidów, ale również rozszerza zastosowanie lipaz w syntezie organicznej.

7. Część eksperymentalna

7.1. Uwagi ogólne

Widma NMR zostały wykonane na aparatach Varian Gemini 200 (200 MHz), Varian Gemini 400 (400 MHz) oraz Bruker DMX 500 Avance (500 MHz). Widma rejestrowano z TMS jako wzorcem wewnętrznym. Przesunięcia sygnałów (δ) podano w ppm, a stałe sprzężenia (J) w hercach (Hz). Sygnały w widmach protonowego jądrowego rezonansu magnetycznego zostały przypisane dla wybranych związków. Widma masowe wysokiej rozdzielczości zarejestrowano na aparacie API 365 (SCIEX). Pomiary skręcalności właściwej zostały wykonane na polarymetrach Jasco DIP-360 oraz Jasco P-2000 przy długości fali $\lambda = 589$ nm, przy użyciu kuwety o długości 1.0 cm i pojemności 1.2 ml. Analizy elementarne wykonano w Pracowni Analizy Elementarnej Instytutu Chemii Organicznej PAN, używając aparatów Perkin Elmer 240 Elemental Analyzer oraz Heraeus Vario EL III. Widma masowe wysokiej rozdzielczości zostały wyznaczone w zespole prof. Witolda Danikiewicza w Instytucie Chemii Organicznej PAN na spektrometrze Mariner (PerSeptive Biosystems).

Do analiz TLC używano płytek aluminiowych pokrytych Kieselgel 60 F₂₅₄ firmy Merck. Do preparatywnego rozdziału i oczyszczania produktów za pomocą chromatografii cienkowarstwowej używano płytek PTLC pokrytych Kieselgel 60 F₂₅₄ o grubości 0,25 mm firmy Merck. Oczyszczanie związków za pomocą chromatografii kolumnowej wykonywano używając żelu krzemionkowego Kieselgel 60 (60 mesh, 70-230 mesh i 230-400 mesh) firmy Merck.

W badaniach przesiewowych enzymów stosowano następujące biokatalizatory: papaina, Novozym 435, CAL-B (natywna), CAL-B (immobilizowana na żywicy akrylowej, Sigma), lipaza kiełków przenicy, Acylaza I (Fluka), Amano lipase AK (Sigma), lipaza z trzystki wieprzowej oraz reokombinowane enzymy z mikroorganizmów: *Rhisopus niveus*, *Rhisopus oryzae*, *Rhisopus arrhisus*, *Candida lipolitica*, *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueufori*, *Pseudomonas* sp.

Do rozdziału enancjomerów metodą HPLC stosowano następujące metody: Metoda A: kolumna chiralna: Chiracel, OD-H, eluent: heksan:2-propanol, 85:15, obj:obj, przepływ = 1 ml/min, $\lambda = 230$ nm; Metoda B: kolumna chiralna: Chiracel, OD-H, eluent: heksan:2-propanol, 85:15, obj:obj, przepływ = 0.8 ml/min, $\lambda = 230$ nm; Metoda C: kolumna: Chiracel, OD-H, eluent: heksan : 2-propanol, 87:13, obj:obj, przepływ = 1 ml/min, $\lambda = 230$ nm. RP-HPLC, Metoda D: kolumna: C-18 Kromasil, eluent: acetonitril:woda, 55:45

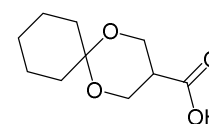
obj:obj, $\lambda = 230$ nm, przepływ = 1.0 ml/min. W pracy enancjoselektywność reakcji (E) liczona była ze wzoru (c – konwersja, ee_p – nadmiar enancjomeryczny produktu):

$$E = \frac{\ln[(1 - c \times (1 + ee_p))]}{\ln[1 - c \times (1 - ee_p)]}$$

Wykorzystywane reagenty komercyjnie dostępne, zakupione były w Sigma-Aldrich, TCI lub Alfa Aeser. Jako eluenty do chromatografii kolumnowej i analiz HPLC stosowano heksan, octan etylu, chloroform, metanol oraz wodę, które wcześniej oczyszczono przez destylację. Pozostałe rozpuszczalniki reagenty oczyszczono według ogólnych metod literaturowych.¹³⁴

7.2. Badania nad syntezą peptydomimetyków z fragmentami elektrofilowymi

7.2.1.1. Związek 104. *Bis*-(hydroksymetylo)-malonian dietulu (**108**, 9.6 g, 0.04 mol), kwas *p*-toluenosulfonowy (0.816 g, 4 mmole) oraz cykloheksanon (6.7 ml) rozpuszczono w heksanie (50 ml). Reagenty

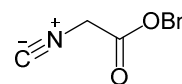


mieszano przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. Mieszaninę odparowano do sucha, rozpuszczono w octanie etylu, przemyto wodorowęglanem sodu (2 x 25ml), solanką (1 x 30 ml). Produkt oczyszczono przez destylację w temperaturze 120 – 121 °C, 0.1 mm Hg (lit.¹³⁵, 120 °C, 0.1 mm Hg). Otrzymano 8.30 g związku **109** (63 %). Widmo NMR zgodne z literaturowym. ¹³⁵ ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.23 – 1.25 (m, 6H), 1.27 – 1.60 (m, 6H), 1.64 – 1.80 (m, 4H), 4.10 – 4.17 (m, 8H); Związek **109** (5.5 g, 0.02 mol) rozpuszczono w etanolu (45 ml) i dodano wodorotlenek potasu (4 g). Ogrzewano w temperaturze 90 °C przez 6 godzin. Wytrącony osad odsączono, przemyto acetonem, rozpuszczono w wodzie a następnie dodano kwasu solnego (10%) do uzyskania pH 4.0. Mieszaninę ekstrahowano octanem etylu (3 x 50 ml). Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano 2.2 g związku **110** (wyd. 50 %). Związek ten rozpuszczono w mieszaninie dioksanu (22 ml) i pirydyny (8 ml). Mieszaninę ogrzewano przez 2 godziny w temp. 90 °C. Rozpuszczalniki odparowano, pozostałość rozpuszczono w eterze etylowym, przemyto kwasem solnym (5%) i wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu. Otrzymano 1.35 g (75% wyd.) kwasu karboksylowego **104**. Analiza NMR zgodna z literaturową [38] ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.40 – 1.53 (m, 6H), 1.69 – 1.80 (dd, $J = 6.4$ Hz, 4H), 2.76 – 2.87 (m, 1H), 4.07 – 4.11 (m, 4H), 10.04 (bs, 1H);

¹³⁴ Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. Purification of laboratory Chemicals, 4th ed, Elsevier: Oxford, 2000.

¹³⁵ Ralbovsky J., L., Sicola, P. M., Sugino, E., Burgos-Garcia, C., Weinreb, S. M., Parves, M., *Heterocycles*, **1996**, 43, 7, p. 1497 – 1512

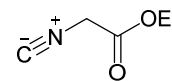
7.2.1.2. Izocyjanoctan benzylu (105a). Alkohol benzylowy (100 ml), glicynę (18.8 g, 0.25 mol) oraz kwasu *p*-toluenosulfonowego (48.5 g, 0.255 mol) rozpuszczono w toluenie (50 ml) i mieszano w temperaturze wrzenia przez 3 godziny, usuwając azeotropowo powstającą wodę. Mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej, dodano 200 ml toluenu oraz 300 ml eteru etylowego. Pozostawiono na 12 godzin w temperaturze 2 °C. Wytrącony osad odsączono, przemyto eterem, następnie rekrytalizowano z układu metanol - eter etylowy uzyskując 60.8 g produktu w postaci soli kwasu *p*-toluenosulfonowego (wyd. 81 %).



W następnym etapie, do 56 g (0.17 mola) soli *p*-toluenosulfonowej estru benzylowego glicyny dodano mrówczan etylu (84 ml). Zawiesinę mieszano w temperaturze wrzenia, dodając trietyloaminę (25 ml). Mieszaninę pozostawiono na noc w temperaturze wrzenia. Dodano wody (600 ml) i ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 100 ml). Fazy organiczne połączono, przemyto roztworem wodorowęglanu sodu (100 ml, 5%) a następnie wodą (100 ml). Wyszuszone bezwodnym siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano uzyskując 21.65 g produktu **28a** w postaci żółtego oleju (66 %);

Do roztworu estru benzylowego N-formyloglicyny (2.0 g, 10 mmoli) w bezwodnym chlorku metylenu (9 ml) dodano bezwodną diizopropylotetyloaminę (4.5 ml, 26 mmoli). Mieszaninę schłodzono do -67 °C. Następnie wkroplono roztwór tlenochlorku fosforu (0.97 ml, 10.3 mmola) w suchym chlorku metylenu (1 ml). Roztwór mieszano w temperaturze 5 °C przez 2 godziny. Dodano wodę destylowaną (2 ml) tak, aby temperatura nie przekroczyła 10 °C. Mieszaninę ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 15 ml). Połączone fazy organiczne przemyto 10% roztworem kwaśnego węglanu sodu (3 x 15 ml). Fazę organiczną suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Otrzymany olej oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej chlorkiem metylenu a następnie krystalizowano z heksanu. Otrzymano 1,52 g produktu z wydajnością 83 %. Widmo NMR zgodne z literaturowym.¹³⁶ ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 4.25 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 7.37 – 7.38 (m, 5H);

7.2.1.3. Izocyjanoctan etylu (105b). Do roztworu N-formylowej pochodnej **106b** estru etylowego glicyny (2.0 g, 15.25 mmol) w bezwodnym chlorku metylenu (9 ml) dodano bezwodną diizopropylotetyloaminę (6.7 ml, 38 mmol). Mieszaninę schłodzono do -78 °C. Następnie wkroplono roztwór tlenochlorku

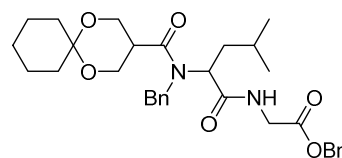


¹³⁶ Burns, D. H., Jabara S. C., Burden W. M., *Syn. Comm.* **1995**, 25, 379

fosforu (1.4 ml, 15.3 mmol) w suchym chlorku metylenu (2 ml). Roztwór mieszano w temperaturze 5 °C przez 1 godzinę. Dodano wodę destylowaną (2 ml) tak, aby temperatura nie przekroczyła 10 °C. Mieszaninę ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 30 ml). Połączone fazy organiczne przemyto 10% roztworem kwaśnego węgla sodu (3 x 30 ml). Fazę organiczną suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Otrzymany olej oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej chlorkiem metylenu. Otrzymano 1,12 g związku z wydajnością 65 %. Widmo NMR zgodne z literaturowym. ¹³⁶ H¹ NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.34 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H), 4.30 (s, 2H), 4.38 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H);

7.2.1.4. Związek 101.

Do roztworu aldehydu izowalerianowego (0.25 ml, 2.3 mmol) w metanolu (2 ml) dodano benzyloaminę (0.25 ml, 2.3 mmol) i mieszaninę pozostawiono na 15 min. Dodano kwasu 1,5-dioksospiro[5.5]undekanokarboksyłowego (457 mg, 2.3 mmol). Mieszaninę schłodzono do 0 °C i dodano izocjanooctanu benzylu (400 mg, 2.3 mmol). Mieszaninę pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Rozpuszczalnik odparowano i pozostałość

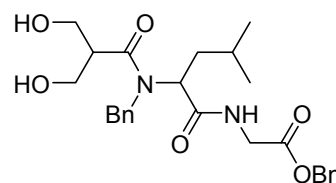


oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej układem heksan:octan etylu (*R_f*=0.16 8:2 obj:obj). Uzyskano 614 mg produktu z 49% wydajnością. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, C(CH₃)₂), 1.25-1.58 (m, 12H, 6xCH₂), 1.64 - 2.05 (m, 3H, CH₂CHMe₂), 3.02 - 3.18 (m, 1H, CHCO), 3.72 - 3.92 (m, 3H, CH₂, CHH), 4.00 - 4.34 (m, 4H, CH₂, CHH, CH(*i*-Bu)), 4.61 (s, 2H, CH₂), 5.16 (s, 2H, ArCH₂), 6.80 - 6.95 (m, 1H NH), 7.10 - 7.17 (m, 2H, ArH), 7.23 - 7.38 (m, 8H, ArH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 22.6, 22.7, 22.8, 23.1, 25.5, 26.0, 27.7, 36.9, 38.3, 40.4, 41.4, 48.5, 55.9, 61.3, 61.6, 67.5, 98.4, 126.1, 127.9, 128.8, 128.9, 129.0, 129.2, 135.5, 137.4, 169.7, 171.3, 173.8;

7.2.1.5. Związek 102.

Związek 101 (579 mg, 1.0 mmol) rozpuszczono w wodnym roztworze kwasu octowego (70%).

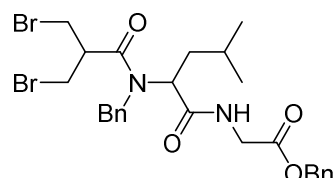
Roztwór mieszano przez 18 godzin w temperaturze pokojowej. Kwas octowy z wodą odparowano pod



zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej układem heksan:octan etylu (*R_f* = 0.08 5:5 obj:obj). Uzyskano 353 mg związku z wydajnością 71%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.72 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CHCH₃), 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CHCH₃), 1.40 - 1.58 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.82 - 1.98 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.02 - 3.18 (m, 1H, CHCO), 3.25 - 3.53 (m, 2H, 2xOH), 3.70 -

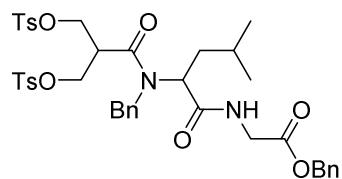
3.88 (m, 4H, 2xCH₂OH), 4.25 - 4.60 (m, 2H, NCH₂CO), 5.00 - 5.22 (m, 3H, ArCH₂, NH), 7.18-7.41 (m, 10H, ArH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 14.5, 21.3, 22.5, 23.0, 25.6, 36.7, 41.4, 46.8, 48.6, 56.4, 60.7, 62.3, 63.4, 67.8, 126.2, 127.7, 128.4, 128.7, 129.0, 129.1, 135.2, 137.7, 171.0, 171.4, 178.3 Analiza elementarna obliczona: C₂₆H₃₄N₂O₆ + H₂O: C, 63.92; H, 7.43; N, 5.73; zbadana: C, 63.92; H, 7.27; N, 5.62;

7.2.1.6. Związek 103a. Związek **102** (100 mg, 0.2 mmola) rozpuszczono w chlorku metylenu (10 ml), dodano czterobromku węgla (148 mg, 0.4 mmola) oraz trifenylofosfiny (123 mg, 0.5 mmola). Całość mieszano przez 24 godziny w



temperaturze pokojowej. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej układem heksan:octan etylu ($R_f = 0.82$, 1:1, obj:obj). Otrzymano 76 mg produktu z wydajnością 60%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.77 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CHCH₃), 0.85 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, CHCH₃), 1.20 - 1.20 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.64 - 1.88 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.21 - 3.88 (m, 6H, CHCHO, 2xCH₂, CHH), 4.03 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, CHH), 4.28 - 4.78 (m, 2H, 2xCH₂), 5.13 - 5.30 (m, 3H, ArCH₂, CH(*i*-Bu)), 7.08 - 7.40 (m, 10H, ArH). ¹³C NMR (50MHz, CDCl₃): δ 22.7, 23.1, 25.6, 30.0, 36.6, 41.4, 48.1, 56.0, 64.5, 68.0, 126.5, 126.9, 127.8, 128.2, 128.8, 129.0, 169.5, 171.3, 173.2, HR-MS (ESI, [M+Na⁺]) zbadana: C₂₆H₃₂N₂O₄Br₂Na: 617.0621, zbadana: 617.0643 *m/z*;

7.2.1.7. Związek 103b. Do roztworu związku **102** (30 mg, 0.06 mmol) w chlorku metylenu (2 ml) dodano *N,N*-dietyloaminopirydynę (10 mg, 0,08 mmol) i diisopropyletyloaminę (0.027 ml, 2.5 mmol). Następnie

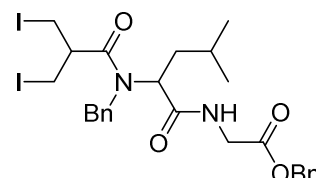


dodano roztwór chlorku kwasu *p*-toluenosulfonowego (27 mg, 0.14 mmola) w chlorku metylenu (3 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 18 godz.. Chlorek metylenu został odparowany a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, $R_f = 0.69$, 1:1, heksan:octan etylu obj:obj). Otrzymano 45 mg produktu z wydajnością 92%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.85 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, CHCH₃), 0.93 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, CHCH₃), 1.35 - 1.63 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.84 - 1.97 (m 1H, CH(CH₃)₂), 2.50 (s, 3H, ArCH₃), 2.53 (s, 3H, ArCH₃), 3.32 - 3.6 (m, 1H, CHCO), 4.03 - 4.27 (m, 6H, 2xOCH₂, ArCH₂N), 4.53 - 4.76 (m, 2H, CH₂CO), 5.15 - 5.30 (m, 1H, CH(*i*-Bu)), 5.24 (s, 2H, ArCH₂O), 6.75 - 6.80 (m, 1H, NH), 7.16 - 7.42 (m,

14H, ArH), 7.70-7.83 (m, 4H, ArH), ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ 20.0, 22.8, 25.4, 37.0, 41.6, 42.8, 48.8, 56.6, 67.3, 67.9, 68.2, 126.4, 128.0, 128.2, 128.6, 128.7, 128.9, 129.2, 130.3, 130.4, 132.4, 136.9, 145.5, 169.9, 170.8, 171.3 ; Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2$: C, 61,68; H, 5,95; N, 3,60; S 8,23; zbadana: C, 61,76; H, 5,81; N, 3,55; S, 8,46%;

7.2.1.8. Związek 103c. Do roztworu estru tosylowego **103b**

(46 mg, 0.06 mmola) w acetonie (3 ml) dodano jodku sodu (54 mg, 0.36 mmola). Reagenty mieszano przez 6 godzin w

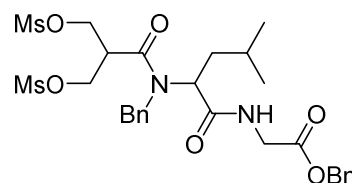


temperaturze wrzenia oraz przez 72 godziny w temperaturze

pokojojej. Odparowano rozpuszczalnik i pozostałość oczyszczono za pomocą kolumny chromatograficznej układem heksan:octan etylu ($R_f = 0.87$, 7:3 obj:obj). Uzyskano 28 mg produktu z wydajnością 68%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 0.85-0.90 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.46 - 1.70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.86 - 1.96 (m, , 1H, CHMe_2), 3.18 - 3.23 (m, 5H, $2\times\text{CH}_2\text{I}$, CHCO), 4.01 - 4.05 (m, 2H, NCH_2Ar), 4.66 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, , NCH_2CO), 5.09 - 5.15 (m, 1H, $\text{CH}(i\text{-Bu})$), 5,18 (s, 2H, ArCH_2O), 7.24 - 7.37 (m, 10H, ArH); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ 5.2, 5.6, 22.8, 23.1, 23.1, 25.5, 37.4, 41.6, 48.2, 49.4, 56.8, 67.5, 126.9, 128.2, 128.7, 128.9, 129.0, 129.4, 135.5, 137.1, 169.6, 170.9, 173.6; Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{I}_2\text{N}_2\text{O}_4$: C, 45,24; H, 4,67; N, 4,06; zbadana: C, 45,34; H 4,77; N 4,05;

7.2.1.9. Związek 103d. Związek **102** (35 mg, 0.07 mmola)

został rozpuszczony w bezwodnym chlorku metylenu (3 ml) i dodano trietyloaminę (25 μl , 0.18 mmola). Mieszanina reakcyjna została schłodzona do 0 $^\circ\text{C}$. Chlorek kwasu

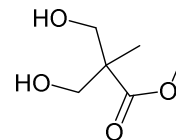


metanosulfonowego został dodany kroplami. (15 μl , 0.17 mmola). Po dodaniu chlorku kwasu metanosulfonowego reakcję pozostawiono na 20 godzin w temperaturze pokojowej. Rozpuszczalnik został odparowany a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Otrzymano 37 mg produktu z wydajnością 84%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ : 0.80 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H, $2\times\text{CHCH}_3$), 1.25 - 1.58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.64 - 2.05 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.91 (s, 3H, SCH_3), 2.94 (s, 2H, SCH_3) 3.40 - 3.51 (m, 1H, CHCO), 3.72 - 3.92 (m, 1H, CHH), 4.03 - 4.55 (m, 6H, $2\times\text{CH}_2$), 4.55 - 4.78 (m, 1H, CHH), 5.12 - 5.20 (m, 2H, ArCH_2O , $\text{CH}(i\text{-Bu})$), 7.10 - 7.17 (m, 2H, ArH), 6.75 (bt, $J = 5.8$ Hz, 1H, NH) 7.23 - 7.38 (m, 8H, ArH); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ : 22.6, 22.7,

22.8, 23.1, 25.5, 26.0, 27.7, 36.9, 38.3, 40.4, 41.4, 48.5, 55.9, 61.3, 61.6, 67.5, 98.4, 126.1, 127.9, 128.8, 128.9, 129.0, 129.2, 135.5, 137.4, 169.7, 171.3, 173.8; HR-MS (ESI, [M+Na⁺]) obliczona dla C₂₈H₃₈N₂O₁₀S₂Na: 649.1860, zbadana: 649.1870 m/z;

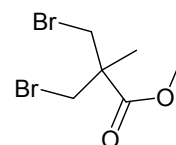
7.2.1.10. Ester metylowy kwasu 2,2-bis-(hydroksymetylo)-propionowego (113).

Kwas bis-(hydroksymetylo)-propionowy (2,5 g, 0,019 mol) rozpuszczono w metanolu (3,77ml 0,093 mola) i uzyskany roztwór schłodzono do temperatury 0 °C w atmosferze azotu. Następnie wkroplono chlorek tionylu (2.0 ml, 0.028 mol), mieszaninę reakcyjną w temperaturze wrzenia mieszano przez 16 godzin. Rozpuszczalnik odparowano i pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej układem heksan:octan etylu (R_f = 0.16, 5:5 obj:obj). Otrzymano 1,5g produktu (wyd. 54%). Analiza NMR zgodna z literaturą¹³⁷: H¹ NMR (200 MHz, CDCl₃): δ: 1.05 (s, 3H), 3.25 (s, 2H), 3.65 – 3.90 (m, 4H), 3.73 (s, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ: 17.5, 49.6, 50.7, 52.5, 67.3, 176.6.;



7.2.1.11. Ester metylowy kwasu 2,2-bis-(bromometylo)propionowego (114).

Do roztworu estru metylowego kwasu bis-(hydroksymetylo)-propionowego w chlorku metylenu (2 ml) dodano diizopropylodetyloaminę (0.4 ml, 2 mmole) oraz dimetyloaminopirydynę (100 mg). Następnie wkroplono chlorek *p*-toluenosulfonowy (406 mg, 2 mmole) w chlorku metylenu (1 ml). Reakcję prowadzono przez 72 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie 6 godzin w temperaturze 40 °C. Odparowano rozpuszczalnik i pozostałość rozdzielano na kolumnie chromatograficznej układem heksan:octan etylu (R_f = 0.24, 7:3 obj:obj). Uzyskano 208 mg produktu (wyd. 45%).

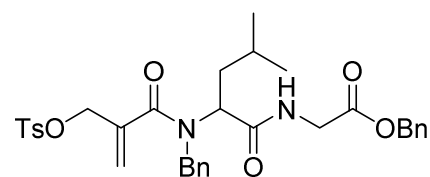


Do roztworu estru metylowego kwasu bis-(*p*-toluenosulfoksy)propionowego (70 mg, 0.15 mmoli) w bezwodnym acetonie (1 ml) dodano bromku litu (266 mg, 3 mmoli). Reakcję prowadzono przez 48 godzin w temperaturze wrzenia. Odparowano rozpuszczalnik i produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej układem heksan:octan etylu (R_f = 0.56, 7:3 obj:obj). Uzyskano 23 mg produktu z wydajnością 55%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ: 1.43 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.65 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 3,73 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ: 22.1, 37.6, 48.8, 53.1, 175,9 Analiza elementarna obliczona dla C₆H₁₀Br₂O₂: C 26,31; H 3.68, zbadana: C 26.73; H 4.00;

¹³⁷ McKenna, M. J., Halley, F., Souness J. E., McLay, I. M., Picket S.D., Collis, A. J., Page, K., Ahmed, I., *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2173

7.2.1.12. Związek 115. Roztwór związku 103b (27 mg,

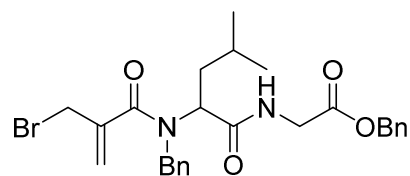
0.04 mmola) w tetrahydrofuranie schłodzone do temperatury -67°C w atmosferze azotu. Dodano wodorek sodu (1 mg, 0.4 mmola). Po 1 godzinie



temperatura osiągnęła temperaturę pokojową. Rozpuszczalnik odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej układem heksan:octan etylu ($R_f = 0.59$, 5:5, obj:obj). Uzyskano 15 mg produktu z wydajnością 71%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 0.77 - 0.85 (m, 6H, $2\times\text{CHCH}_3$), 1.40 - 1.68 (m, 1H, CHCH_3), 1.80 - 2.10 (m, 2H, CH_2CHCH_3), 2.44 (s, 3H, ArCH_3), 3.92 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, OCH_2), 3.80 - 4.0 (m, 5H, ArCH_2N , NCH_2CO , NCHCO), 5.17 (s, 2H, ArCH_2O), 5.44 (s, 1H, $\text{CHH}=\text{C}$), 5.55 (s, 1H, $\text{CHH}=\text{C}$), 7.23-7.34 (m, 12H, ArH), 7.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ 22.0, 22.9, 23.8, 25.3, 32.7, 41.6, 67.4, 69.1, 103.4, 119.9, 127.9, 128.1, 128.4, 128.6, 128.7, 128.9, 130.3, 135.6, 137.9, 169.8, 170.7, 171.3; Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_7\text{S} + 0.5 \text{H}_2\text{O}$: C, 64.37; H, 6.38; N, 4.55; S, 5.21; zbadana: C, 64.31; H, 6.33; N, 4.41; S, 5.17.;

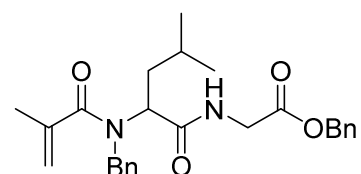
7.2.1.13. Związek 116a. Do roztworu związku 115 (94

mg, 0,15 mmola) w acetonie (3 ml) dodano bromku litu (13 mg, 0,15 mmola). Po 1 odparowano rozpuszczalnik i pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii



kolumnowej układem heksan:octan etylu ($R_f = 0.26$, 7:3, obj:obj). Otrzymano 76 mg produktu z wydajnością 95%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ : 0.82 - 0.87 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.51 - 1.53 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.66 - 1.77 (m, 1H, $\text{CHHCH}(\text{CH}_3)_2$), 1.96 - 2.01 (m, 1H, $\text{CHHCH}(\text{CH}_3)_2$), 3.89 - 4.01 (m, 2H, CH_2), 4.15 - 4.26 (m, 2H, CH_2), 4.58 - 4.81 (m, 3H, NCHCO , CH_2), 5.18 (s, 2H, ArCH_2O), 5.37 (s, 1H, $\text{HHC}=\text{C}$), 5.49 (s, 1H, $\text{HHC}=\text{C}$), 7.32 - 7.37 (m, ArH 10H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ : 22.4, 23.0, 25.1, 26.9, 33.2, 37.3, 41.3, 41.5, 52.4, 67.1, 118.9, 127.5, 128.4, 128.5, 128.6, 135.2, 140.1, 169.9, 170.4, 171.9; Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{BrN}_2\text{O}_4$: C, 60.59; H, 6.06; N, 5.43; zbadana: C, 60.92; H, 6.11; N, 5.01; HR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$); obliczona: $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4\text{BrNa}$: 537.1359, zbadana: 537.1356 m/z .

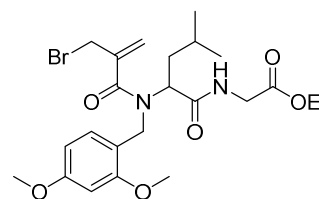
7.2.1.14. Związek 116b. Do roztworu aldehydu izowalerioanowego (20 mg, 0.2 mmola) w metanolu (1 ml)



dodano benzyloaminę (25 mg, 0.2 mmola). Mieszano 15 minut. Dodano kwas metakrylowy (20 mg, 0.2 mmola) i mieszano przez kolejne 15 minut. Dodano izocjanooctan benzylu (40 mg, 0.2 mmola). Mieszaninę pozostawiono na 20 godzin w temperaturze pokojowej. Odparowano rozpuszczalnik a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej układem heksan:octan etylu ($R_f = 0.58$, 5:5, obj:obj). Otrzymano 36 mg produktu z wydajnością 36%. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ : 0.76 – 0.87 (m, 6H, 2x CH_3), 1.40 – 1.80 (m, 3H, CH_2CHMe_2), 1.82 – 1.92 (m, 3H, CH_3), 3.90 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH_2), 4.62 (s, 2H, CH_2), 4.76 (t, $J = 10$ Hz, 1H, $\text{CH}(i\text{-Bu})$), 5.0 – 5.25 (m, 4H, ArOCH_2 , $\text{C}=\text{CH}_2$), 7.21 – 7.36 (m, 10H, ArH); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ : 20.8, 22.7, 22.9, 25.4, 41.5, 67.4, 116.5, 127.8, 128.0, 128.7, 128.8, 128.8, 129.0, 141.0, 169.7, 171.4; HR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczona dla $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$: 459.2254, zbadana: 459.2237 m/z ;

7.2.1.15. Związek 117. Do roztworu aldehydu izowalerianowego

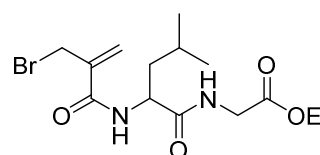
(96 μl , 0.88 mmola) w etanolu 99% (1 ml) dodano 2,4-dimetoksybenzyloaminę (133 μl , 0.88 mmola) i mieszano przez 30 minut. Mieszaninę schłodzono do temperatury 0 °C i dodano



izocjanooctan etylu (100 μl , 0.88 mmola) Następnie dodano kwas bromometylometakrylowy (146 mg, 0.88 mmola) i mieszano przez 6 godz. w temperaturze 0 °C. Odparowano rozpuszczalnik a pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej układem heksan:octan etylu ($R_f = 0.33$, 5:5, obj:obj). Otrzymano 274 mg produktu (61%). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 0.84 - 0.89 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.21 - 1.28 (m, 4H, OCH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.50 - 1.67 (m, 1H, $\text{CHHCH}(\text{CH}_3)_2$), 1.88 – 2.00 (m, 1H, $\text{CHHCH}(\text{CH}_3)_2$), 3.77 (s, 6H, ArOCH_3), 3.85 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, NCHCO), 4.04 - 4.23 (m, 4H, BrCH_2 , $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.55 - 4.70 (m, 2H, NCH_2CO), 5.43 (s, 1H, $\text{HHC}=\text{C}$), 5.54 (s, 1H, $\text{HHC}=\text{C}$), 6.39 - 6.43 (m, 2H, ArH), 7.43 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, ArH) $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 14.5, 22.8, 22.9, 25.5, 33.4, 37.6, 41.7, 55.6, 55.6, 59.1, 61.6, 98.7, 104.3, 119.3, 130.3., 140.4, 160.5, 171.8, 175.5. HR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczona dla $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{BrN}_2\text{O}_6$ Na: 535.1414, zbadana: 535.1402 m/z ;

7.2.1.16. Związek 118. Związek 117 (117 mg, 0.23 mmola)

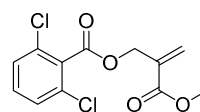
rozpuszczono w chlorku metylenu (2 ml), następnie dodano w temperaturze pokojowej kwas trifluoroctowy (475 μl).



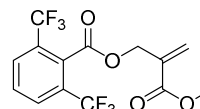
Mieszaninę pozostawiono na 1 godzinę obserwując zmianę koloru z bezbarwnego, przez żółty, bordowy na ciemnofioletowy. Zawartość kolby przeniesiono do rozdzielacza, dodano chlorku metylenu (4 ml) i dodawano nasycony roztwór węglanu sodu do momentu zniknięcia barwy fioletowej. Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 8 ml) następnie połączone fazy organiczne wysuszono solanką i odparowano rozpuszczalnik. Pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej układem heksan:octan etylu ($R_f = 0.25$, 6:4, obj:obj). Otrzymano 58 mg produktu (70 %). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 0.87-0.94 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 1.38 - 1.70 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.88 - 4.12 (m, 2H, NHCH_2), 4.12 - 4.22 (m, 4H, OCH_2CH_3 ; BrCH_2C), 4.60-4.78 (m, 1H, NHCH), 5.69 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.85 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.90 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 7.14 (bs, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 14.5, 22.4, 23.3, 25.1, 30.7, 41.4, 41.7, 52.1, 61.8, 123.0, 141.3, 166.4, 170.0, 172.6; HR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczona dla $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{Na}$: 385.0733, zbadana: 385.0740 m/z ;

7.2.1.17. Ogólna metoda estryfikacji solą cezową syntezy związków 120a,b, 122a,b, 123a,b. Związek z grupą 2-(bromometylo)akrylowa (**111**, **117**, **118**) rozpuszczono w acetonie ($c=0.04$ mmol/ml) i dodano sól cezową (**121a** lub **121b**, 3 równ.). Zawiesinę mieszano w temperaturze wrzenia do zaniku substratu. Aceton odparowano a pozostałość zawieszono w octanie etylu. Dodano nasyconego roztworu wodorotlenku sodu. Gdy osad się rozpuścił, przemyto naczynie octanem etylu i fazy rozdzielono. Przemyto solanką i wysuszono siarczanem magnezu. Gdy zachodziła potrzeba, produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, eluent: heksan, octan etylu);

7.2.1.18. Związek 120a. Otrzymano według ogólnej metody syntezy 7.2.1.17 z estru **111** i soli cezowej **121a**. Wydajność 97%. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 3.81 (s, 3H, OCH_3), 5.13 (d, $J = 0.8$ Hz, 2H, CH_2), 6.04 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, CCHH), 6.46 (s, 1H, CCHH), 7.29-7.31 (m, 3H, ArH); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 52.5, 64.3, 128.2, 129.1, 131.3, 132.2, 134.7, 133.5, 134.7, 164.5, 165.8. Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}_4$: C, 49.85; H, 3.49; obliczona: C, 49.52; H, 3.39;



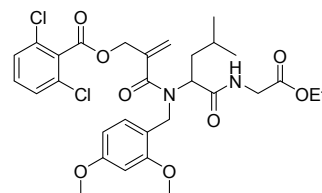
7.2.1.19. Związek 120b. Otrzymano według ogólnej metody syntezy 7.2.1.17 z estru **111** i soli cezowej **121b**. Wydajność 88%. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 3.80 (s, 3H, OCH_3), 5.01 (d, $J = 0.6$ Hz, 2H, CH_2),



6.00 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, CCHH), 6.47 (s, 1H, CCHH), 7.71 (m, 1H, ArH), 7.92 (d, $J = 8$ Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ 52.5, 65.2, 120.4, 129.9, 130.0, 130.6, 134.3, 165.8, 164.0; Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_6\text{O}_4$: C, 47.21; H, 2.83; zbadana: C, 47.26; H, 2.97;

7.2.1.20. Związek 122a. Otrzymany metodą ogólną 7.2.1.17.z

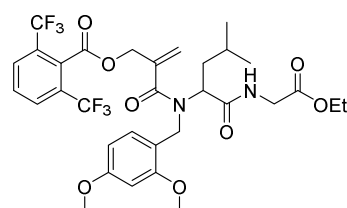
peptydomimetyku **117** i soli cesowej **121a**. Wydajność 71%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ : 0.85 (d, $J = 6.2$ Hz, 6H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.42 – 1.60 (m, 1H, CHMe_2), 1.74 – 1.99



(m, 2H, CH_2CHMe_2), 3.60 – 3.74 (m, 2H, CH_2), 3.77 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 4.17 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 4.44 – 4.56 (m, 1H, $\text{CH}(i\text{-Bu})$), 4.63 (s, 2H, CH_2), 5.14 (s, 2H, CH_2), 5.55 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.70 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.32 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, ArH), 6.37 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, ArH), 7.08 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, ArH), 7.31 – 7.35 (m, 3H, ArH). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ : 14.5, 22.6, 23.0, 23.1, 25.3, 30.0, 41.6, 55.6, 55.6, 61.6, 97.3, 98.6, 104.2, 119.1, 128.2, 131.4, 132.3, 138.72, 164.5. Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_8 + 2\text{H}_2\text{O}$: C, 54.63; H, 6.11; N, 4.25; zbadana: C, 54.69; H, 5.98; N, 4.00; HR-MS (ESI, $[\text{M} + \text{Na}^+]$) obliczona dla $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}$ 645.1741, zbadana: 645.1743 m/z ;

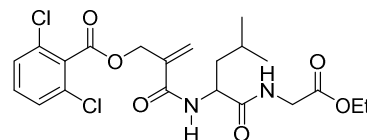
7.2.1.21. Związek 122b. Otrzymany metodą ogólną 7.2.1.17 z peptydomimetyku **117** i soli cesowej **121b**. Wydajność 80%,

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ : 0.83 – 0.88 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.40 – 1.62 (m, 1H,



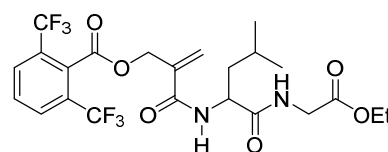
CHMe_2), 1.68 – 2.00 (m, 2H, CH_2CHMe_2), 3.50 – 3.70 (m, 2H, CH_2), 3.76 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 4.18 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.40 – 4.54 (m, 1H, $\text{CH}(i\text{-Bu})$), 4.61 (s, 2H, CH_2), 5.11 (s, 2H, CH_2), 5.55 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.65 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 6.38 (d, $J = 2.4$ Hz 1H, ArH), 7.06 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.72 - 7.78 (m, 1H, ArH), 7.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH), ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ : 14.4, 22.5, 23.0, 25.3, 30.0, 37.3, 41.6, 55.5, 55.6, 61.6, 66.9, 98.7, 104.2, 119.3, 125.8, 130.1, 130.7, 138.2, 158.6, 169.7, 171.5; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_8$: C, 55.65; H, 5.25; N, 4.06; zbadana: C, 55.56; H, 5.39; N, 3.90;

7.2.1.22. Związek 123a. Otrzymany metodą ogólną 7.2.1.17 ze związku **118** i soli cesowej **121a**. Wydajność 59%, białe kryształy, $t_m = 120-121\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3):



δ : 0.83 (d, $J = 6\text{ Hz}$, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.20 (t, $J = 7.0\text{ Hz}$, 3H, OCH_2CH_3), 1.47 - 1.69 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.81 - 4.07 (m, 2H, NHCH_2COO), 4.12 (q, $J = 7.0\text{ Hz}$, 2H, OCH_2CH_3), 4.51 - 4.60 (m, 1H, NCH), 5.07 (d, $J = 4.2\text{ Hz}$, 2H, OCH_2C), 5.78 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.00 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.56 (d, $J = 8.2\text{ Hz}$, 1H, NH), 6.77 (bs, 1H, NH), 7.20-7.25 (m, 3H, ArH); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ : 14.5, 22.4, 23.2, 25.1, 41.2, 41.7, 51.9, 61.9, 65.1, 124.6, 128.2, 131.4, 132.2, 138.1, 166.4, 169.8, 172.28 HR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczona dla: $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$: 495.1060; zbadano: 495.1081 m/z ;

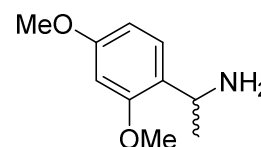
7.2.1.23. Związek 123b. Otrzymany metodą ogólną 7.2.1.17 ze związku **118** i soli cesowej **121b**. Wydajność 87% białe kryształy, $mp = 114-115\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ



0.89 (d, $J = 6.1\text{ Hz}$, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.27 (t, $J = 7.1\text{ Hz}$, 3H, CH_2CH_3), 1.52 - 1.76 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.87 - 4.10 (m, 2H, NHCH_2), 4.19 (q, $J = 7.0\text{ Hz}$, 2H, CH_2CH_3), 5.07 - 5.17 (m, 2H, ArCH_2), 5.81 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.04 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.62 (d, $J = 8.2\text{ Hz}$, 1H, NH), 6.89 (t, $J = 5.2\text{ Hz}$, 1H, NH), 7.68 - 7.77 (m, 1H, ArH), 7.92 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 2H, ArH) $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 14.4, 22.4, 23.0, 25.0, 30.7, 41.2, 41.6, 51.9, 61.8, 65.6, 120.0, 124.3, 125.8, 129.0, 129.7, 130.2, 130.7, 137.9, 164.8, 166.4, 169.9, 172.6; Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_6$: C, 51.11; H, 4.85; N, 5.18; zbadana: C, 51.00; H, 5.07; N, 4.86, HPLC: Metoda C: $t_{R1} = 6.8\text{ min}$, $t_{R2} = 7.7\text{ min}$; RP-HPLC, Metoda D: $t_R = 10.2\text{ min}$

7.3. Badania nad opracowaniem enzymatycznej syntezy nowego pomocnika chiralnego do reakcji Ugięgo

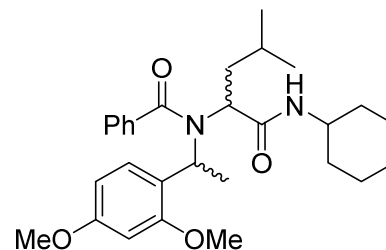
7.3.1.1. α -2,4-(dimetoksyfenylo)etyloamina (200). Amina została otrzymana według zmodyfikowanej procedury opisanej w literaturze.¹²⁵ Węglan amonu (13,5 g, 0,14 mola) rozpuszczono w 10.2 ml kwasu mrówkowego (80%_{aq}). Mieszaninę ogrzano do temp. $135\text{ }^\circ\text{C}$ i mieszano przez 2 godz. Następnie schłodzono do temperatury pokojowej. Dodano 2,4-dimetoksybenzofenonu (12.7 g, 70 mmoli). Ogrzano mieszaninę do temperatury wrzenia i oddestylowano wodę do momentu aż temperatura reakcji osiągnęła $175\text{ }^\circ\text{C}$ a mieszanina



stała się jednofazowa. Mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej po czym dodano dichlorometan (400 ml). Fazę organiczną przemyto 2N NaOH (100ml), następnie wodą (100 ml). Fazy rozdzielono i fazę organiczną wysuszono siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano uzyskując żółto-czerwony osad. Związek rekrytalizowano z układu heksan – octan etylu. Uzyskano 12 g białego proszku z wydajnością 37%.

Uzyskany w poprzednim etapie amid **201** (2 g, 9.5 mmoli) zawieszono w wodnym roztworze NaOH (2 N, 20 ml). Mieszaninę ogrzano do wrzenia (110 °C) i mieszano w tej temperaturze przez 4 godziny. Mieszaninę schłodzono i dodawano kroplami stężony kwas solny do momentu aż pH = 2. Fazę wodną przemyto eterem dietylowym (2 x 50 ml). Następnie dodawano 4N NaOH kroplami do momentu gdy pH = 13. Fazę wodną ekstrahowano dichlometanem (2x100 ml). Rozpuszczalnik odparowano. Surową aminę **200** oczyszczono przez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem (100 – 101°C, 0.1 mm Hg). Otrzymano 1 g produktu z wydajnością 58%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.44 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.72 (s, 2H, NH₂), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 4.34 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, -CHPh(CH₃)), 6.50 – 6.55 (m, 2H -ArH), 7.26 – 7.31 (m, 1H, -ArH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 23.6, 45.9, 55.5, 55.6, 98.9, 104.0, 126.4, 128.6, 158.0, 159.7;

7.3.1.2. Związek 202. 1-(2,4-dimetoksy)fenyloetyloaminę (220 mg, 1.21 mmola) rozpuszczono w metanolu, dodano aldehyd izowalerianowy (130 μl, 1.21 mmola). Po 15 minutach dodano kwas benzoesowy (148 mg, 1.21 mmola) i mieszaninę schłodzono do 0 °C. Dodano izocyjanek

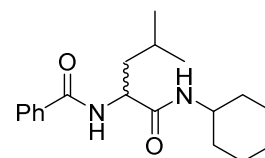


heksylowy (151 μl, 1.21 mmola). Reakcję prowadzono przez 30 min w 0 °C a następnie 6 godzin w temperaturze pokojowej. Metanol odparowano, a pozostałość oczyszczano na kolumnie chromatograficznej. Otrzymano 450 mg mieszaniny diastereoizomerów (2:1) z wydajnością 77 %. (*R*_{f1}=0.33; *R*_{f2}=0.16, heksan:octan etylu 3:2, obj:obj). Diastereoizomer 1: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.45 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 0.6 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.05 – 1.11 (m, 1H, -CH(CH₃)₂-), 1.16 – 1.26 (m, 4H, 2x-CH₂-), 1.32 – 1.40 (m, 2H -CH₂-), 1.51 – 1.56 (m, 1H -CHH-), 1.60 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, ArCH(CH₃)), 1.65 – 1.69 (m, 2H -CH₂-), 1.83 – 1.89 (m, 2H, CH₂), 2.33 – 2.39 (m, 1H, CHH), 3.61 (dd, *J*₁ = 10.4 Hz, *J*₂ = 5.0 Hz, 1H, CH(CH₂)), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.75 – 3.81 (m, 1H, CH(*i*-Bu)), 5.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH(CH₃)Ar), 6.39 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.49 (dd, *J*₁ = 8.6 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.3 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.41 – 7.50 (m, 5H, ArH) 7.96 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 18.1, 21.6, 23.0, 24.6, 25.3, 25.6,

32.6, 32.7, 39.7, 47.6, 53.4, 54.1, 54.8, 55.5, 61.0, 98.6, 103.7, 119.1, 126.0, 128.1, 129.1, 129.5, 138.3, 158.9, 161.1, 172.0, 173.8; Diastereoizomer 2: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.81 – 0.91 (m, 1H, CHH), 0.94 – 1.01 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.10 – 1.20 (m, 1H, CHH), 1.24 – 1.33 (m, 3H, $\text{CH}_2 \text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.48 – 1.54 (m, 2H, CH_2), 1.58 – 1.65 (m, 2H, CH_2), 1.60 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, ArCHCH_3), 1.77 – 1.82 (m, 2H, CH_2), 1.87 – 1.93 (m, 1H, CHH) 2.16 – 2.22 (m, 1H, CHH), 3.36 – 3.42 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 3.63 – 3.67 (m, 1H, $\text{CH}(i\text{-Bu})$), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 5.18 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H, $\text{CH}(i\text{-Bu})$), 6.34 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, ArH), 6.48 (dd, $J_1 = 2.3$ Hz, $J_2 = 8.5$ Hz, 1H, ArH) 7.24 – 7.26 (m, 1H, ArH), 7.46 – 7.47 (m, 3H, ArH), 7.55 – 7.56 (m, 2H, ArH); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 17.8, 22.8, 23.0, 24.5, 25.7, 25.8, 29.7, 32.7, 39.8, 47.4, 52.8, 53.4, 54.9, 55.4, 59.0, 98.8, 103.9, 119.3, 126.8, 128.1, 128.8, 129.8, 137.8, 137.8 158.4, 161.0 171.1, 173.1; HR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczono dla: $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$: 503.2880, zbadano: 503.2895 m/z ;

7.3.1.3. Związek 203. Otrzymano według metody opisanej w

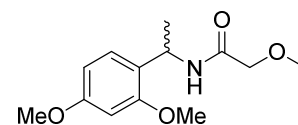
7.2.1.16 ze związku **202**. Otrzymano Wydajność 73%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.97 (d, $J = 4.7$ Hz, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.07 – 1.23



(m, 3H, $-\text{CH}_2-$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.25 – 1.40 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.57 – 1.60 (m, 1H, $-\text{CHH}-$), 1.64 – 1.77 (m, 5H, $-\text{CHH}-$, $2 \times \text{CH}_2-$), 1.81 – 1.92 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.68 – 3.77 (m, 1H, $-\text{NHCH}-$), 4.63 – 4.69 (m, 1H, $-\text{CH}(i\text{-Bu})-$), 6.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 6.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 7.39 – 7.43 (m, 2H, ArH), 7.47 – 7.51 (m, 1H, ArH), 7.78 – 7.82 (m, 2H, ArH); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 22.8, 23.2, 25.1, 25.3, 25.8, 33.1, 33.3, 41.9, 48.7, 52.6, 127.4, 128.9, 132.0, 134.3, 167.7, 171.4; HR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczono dla: $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$: 339.2043, zbadana: 339.2057 m/z

7.3.1.4. N-[1-(2,4-Dimetoksyfenylo)etylo]-2-

metoksyacetamid (205). Synteza chemiczna. Racemiczną α -2,4-(dimetoksyfenylo)etyloaminę (100 mg, 0.55 mmola)



rozpuszczono w metoksyoctanie metylu (12 ml, 11 mmoli). Reakcję prowadzono przez 18 godz. w temperaturze wrzenia. Reakcję schłodzono do temperatury pokojowej i dodano octanu etylu. Fazę organiczną przemyto kwasem cytrynowym (10%_{aq}) oraz solanką. Fazę organiczną odparowano i wysuszono siarczanem magnezu. Amid został otrzymany jako białe kryształy z wydajnością 68% (90 mg). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.51 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 3.45 (s, 3H, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$) 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 3.80 – 4.01 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$) 5.27 – 5.34 (m, 1H, $-\text{CHPh}(\text{CH}_3)$), 6.46 – 6.54 (m, 2H $-\text{ArH}$),

7.16 – 7.20 (m, 1H, -ArH), 7.43 (bs, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 21.9, 46.3, 55.6, 55.6, 59.4, 72.4, 99.5, 104.3, 123.6, 128.6, 158.3, 160.4, 168.4; HR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczono dla: $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{Na}$: 276.1206, zbadana, 276.1202 m/z ; Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: C, 61.64; H, 7.56; N, 5.53; zbadana: C, 61.50; H, 7.59; N, 5.46; HPLC: (Metoda B), $t_{R1} = 8.9$ min; $t_{R2} = 10.6$ min;

7.3.1.5. (R)-N-[1-(2,4-Dimetoksyfenylo)etylo]-2-metoksyacetamid. Racemiczną 1-(2,4-dimetoksyfenylo)etyloaminę rozpuszczono w toluenie (20 mg/ml) i dodano enzym. (10%_w). następnie dodano metoksyoctan metylu (3 eq). Reakcję prowadzono na wytrząsarce przez 48 godz. Enzym odsączono i fazę organiczną przemywano kwasem solnym (1N), kiedy w roztworze nie było już aminy (TLC). Toluenu odparowano, otrzymując czysty amid. Wyniki przedstawiono w Tabeli 7. Nadmiar enancjomeryczny badano za pomocą HPLC (Metoda B, mieszanina racemiczna: $t_{R1} = 8.9$ min; $t_{R2} = 10.6$ min). Dla Novozymu 435, ee > 99.9%, $[\alpha]_D = +111$ (c = 0.50, CHCl_3). Reakcja z Novozymem 435 wykonana została dla 6 g aminy. W tym wypadku surowy produkt rekrytalizowano z układu heksan-octan etylu. Po krystalizacji otrzymano amid **205** z ee > 99.9 % i wydajnością 48%. HPLC: Metoda B, $t_R = 8.9$ min; (izomer R).

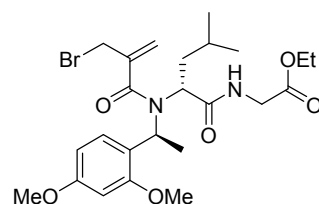
7.3.1.6. (S)- α -2,4-(dimetoksyfenylo)etyloamina. Synteza enzymatyczna. Reakcję enzymatyczną wykonano jak w punkcie 7.3.1.5 z Novozymem 435. Do połączonej fazy wodnej, zawierającej chlorowodorek utworzony z nieprzereagowanej aminy **200**, dodawano 2N NaOH, do momentu gdy pH = 13. Dodano chlorek metylenu i ekstrahowano 3 razy. Chlorek metylenu odparowano, a odzyskaną aminę oczyszczono przez destylację analogicznie do racemicznej aminy. Otrzymano (S)- α -2,4-(dimetoksyfenylo)etyloaminę z wydajnością 42%. $[\alpha]_D = -17$ (c = 0.85, CHCl_3). W celu wyznaczenia nadmiaru enancjomerycznego, aminę przeprowadzono w acetamidamid **204**. W tym celu do roztworu aminy w DCM, dodano 2 równ. Ac_2O w temperaturze pokojowej. Po 2 godz. reakcję przemyto roztworem kwasu solnego (1N), następnie solanką i wysuszono siarczanem magnezu. Surowy produkt reakcji badano za pomocą HPLC, Metoda A, $t_R = 11.2$ min, ee > 99%. HPLC dla racemicznego amidu: Metoda A, $t_{R1} = 8.4$ min, $t_{R2} = 11.2$ min;

7.3.1.7. Związek 206a,b. Procedura dla wysokiego stężenia reagentów: Do roztworu aminy **200** (393 mg, 2.17 mmola) w etanolu (99%, 4 ml) dodano aldehyd izowalerianowy (232 μl , 2.17 mmola) i reakcję mieszało przez 30 min w temperaturze

pokojujowej. Reakcję schłodzono do temperatury 0 °C, dodano izocyjanooctan etylu (237 µl, 2.17 mmola) oraz kwas 2-(bromometylo)akrylowy (358 mg, 2.17 mmola). Reakcję prowadzono 2 godziny w 0 °C, a następnie 24 godz. w -78 °C. Etanol odparowano, a pozostałość oczyszczano na kolumnie chromatograficznej układem heksan – octan etylu. Otrzymano 957 mg mieszaniny diastereoizomerów z wydajnością 84%. Diastereoizomery rozdzielano z użyciem preparatywnych płytek TLC lub chromatografii kolumnowej układem heksan - izopropanol 95:5, obj:obj. Stosowano również analogiczną procedurę przy stężeniu reagentów c=0.03M (Opis w Tabeli 8).

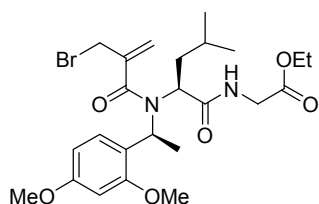
7.3.1.8. Związek 206a, (stereoizomer (S,R)): ¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃): δ 0.39 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.58 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 1.05 – 1.12 (m, 1H, -CH_HCH(CH₃)₂), 1.18 – 1.27 (m, 1H, -CH_HCH(CH₃)₂), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, -CHCH₃), 2.28 – 2.35 (m, 1H, -CH₂CH(CH₃)₂), 3.60 – 3.66 (m, 1H, -CH(*i*-Bu)), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 1H, OCH₃), 3.86 (dd, *J*₁ = 18.5 Hz, *J*₂ = 5.1 Hz, 1H, -NHCH_HCO-), 4.07 (dd, *J*₁ = 18.0 Hz, *J*₂ = 6.3 Hz, 1H, -NHCH_HCO-), 4.17 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.20 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, BrCH_H-), 4.48 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, BrCH_H-), 5.36 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H, -CHCH₃), 5.69 (s, 2H, C=CH₂), 6.44 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar_H), 6.52 (dd, *J*₁ = 8.5 Hz, *J*₂ = 2.2 Hz, 1H, Ar_H), 7.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar_H), 8.08 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.5, 18.8, 21.6, 23.3, 25.4, 32.0, 39.8, 41.6, 54.1, 55.5, 55.8, 60.1, 61.5, 99.1, 104.4, 119.0, 119.5, 130.1, 141.4, 158.9, 161.5, 170.0, 171.6, 173.5;



7.3.1.9. Związek 206b, (stereoizomer (S,S)): ¹H NMR

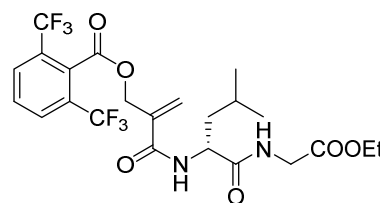
(400 MHz, CDCl₃): δ 0.93 (dd, *J*₁ = 6.5 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz, 6H, 2xCH₃), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.59 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CHCH₃), 1.63 – 1.76 (m, 1H, -CH₂CH-), 2.23 – 2.29 (m, 1H, -CH(CH₃)₂), 3.49 (dd, *J*₁ = 18.4 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz, 1H, -CH_HCOOEt), 3.58 (s, 1H, CH(*i*-Bu)), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (m, 4H, OCH₃, CH_HCOOEt), 4.12 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.26 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, BrCH_H-), 4.43 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H BrCH_H-), 5.43 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H CHCH₃), 5.68 (s, 1H, C=CH_H), 5.78 (s, 1H, C=CH_H), 6.37 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H Ar_H), 6.48 (dd, *J*₁ = 8.6 Hz, *J*₂ = 2.3 Hz, Ar_H), 7.24 – 7.26 (m, 1H, Ar_H), 7.34 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.4, 18.5, 22.9, 23.2, 25.1, 26.2, 32.0, 40.2, 41.8, 52.9, 55.7, 55.8, 58.4, 61.4, 99.0, 104.3, 118.9, 120.0, 129.4, 141.4, 158.5, 161.5, 169.9,



171.2, 172.0; Analiza elementarna obliczona dla: $C_{24}H_{35}N_2O_6Br+0.25H_2O$: C, 54.19; H, 6.73; N, 5.27; zbadana: C, 54.18; H, 6.80; N, 5.30;

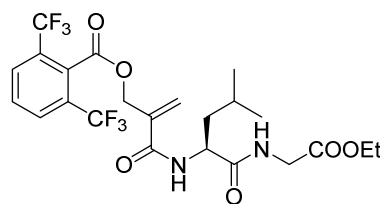
7.3.1.10. Związek 123b. Izomer (R): Związek 206a

(111 mg, 0.2 mmola) rozpuszczono w chlorku metylenu (1.8 ml) i dodano kwas trifluorooctowy (435 μ l). Mieszano przez 1 godzinę. Dodano chlorek metylenu (15ml) oraz roztwór wodorowęglanu sodu (nas.) do momentu odbarwienia się mieszaniny. Fazy rozdzielono a chlorek metylenu odparowano. Surowy produkt rozpuszczono w acetonie i dodano sól cezową kwasu 2,6-bis-(trifluorometyl)benzoesowego (215 mg). Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia przez 2 godz. Aceton odparowano a pozostałość zawieszono w octanie etylu. Fazę organiczną przemyto wodorowęglanem sodu, solanką a następnie wysuszono siarczanem sodu. Octan etylu odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Otrzymano 73 mg produktu z wydajnością 68%. $[\alpha]_D = 23$ (c = 0.9, $CHCl_3$), ee = 92%, HPLC: Metoda C: $t_{R2} = 7.7$ min);



Izomer (S): Związek 206b (186 mg, 0.36 mmola)

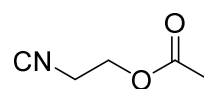
rozpuszczono w chlorku metylenu (3.2 ml) i dodano kwas trifluorooctowy (750 μ l). Mieszano przez 1 godzinę. Dodano chlorek metylenu (20 ml) oraz roztwór wodorowęglanu sodu (nas.) do momentu odbarwienia się mieszaniny. Fazy rozdzielono a chlorek metylenu odparowano. Surowy produkt rozpuszczono w acetonie i dodano sól cezową kwasu 2,6-bis-(trifluorometyl)benzoesowego (425 mg). Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia przez 2 godz. Aceton odparowano a pozostałość zawieszono w octanie etylu. Fazę organiczną przemyto wodorowęglanem sodu, solanką a następnie wysuszono siarczanem sodu. Octan etylu odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Otrzymano 112 mg produktu z wydajnością 57%. $[\alpha]_D = -26$ (c = 0.5, $CHCl_3$), ee = 90%, HPLC: Metoda C: $t_{R1} = 6.8$ min;



7.4. Badania nad syntezą biblioteki β -acyloksymetakryloamidów

7.4.1. Synteza substratów do reakcji Ugiiego

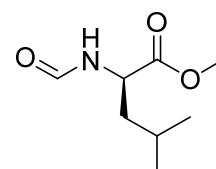
7.4.1.1. Octan-2-izocyjanoetylu (105c). Mieszaninę 2-aminoetanolu (10 ml, 166 mmoli) i mrówczanu etylu (30 ml, 370 mmoli) ogrzewano do temperatury wrzenia przez 3 godziny. Mieszaninę reakcyjną



ochłodzono do temperatury pokojowej, składniki lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując *N*-(2-hydroksyetylo)formamid (15 g), który użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Do produktu dodano bezwodnik kwasu octowego (30 ml, 32 mmoli). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano do temperatury wrzenia przez 5 godzin, następnie ochłodzono do temperatury pokojowej i składniki lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując octan 2-formamidoetylu (21 g) w postaci bezbarwnego oleju, który użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Część otrzymanego formamidu (3 g, 23 mmoli) rozpuszczono w dichlorometanie (30 ml) i dodano trietyloaminę (16 ml, 115 mmol). Mieszaninę schłodzono do temperatury -60 °C i wkraplano tlenochlorek fosforu (2.5 ml, 27.6 mmol) przez 30 minut. Mieszanę reakcyjną mieszano podnosząc temperaturę do temperatury pokojowej, w której reakcję prowadzono przez kolejne 2 godziny. Mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem. Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (3 × 30 ml). Fazy organiczne połączono, przemyto solanką (50 ml), wysuszono (MgSO₄) i rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, 60 mesh, dichlorometan). Wydajność całkowita 50%; 1.35 g (11.9 mmola) żółtego oleju; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 3.55-3.65 (m, 2H, CH₂O), 4.15-4.25 (m, 2H, CH₂N); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 20.8, 41.0, 61.4, 97.4, 170.7;

7.4.1.2. (2*S*)-2-(formyloamino)-4-metylopentanian metylu.

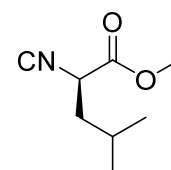
Mieszaninę chlorowodoru estru metylowego leucyny, (2 g, 11 mmol) i ortomrówczanu etylu (15 ml, 90 mmol) ogrzewano do temperatury 40° C. Nadmiar ortomrówczanu etylu odparowano pod zmniejszonym



ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 71%; 1.35 g (7.8 mmola) produktu; t. wrz. 150 °C (2.0 mmHg) ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.95 (dd, *J*₁ = 5.8 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, 6H), 1.50-1.76 (m, 3H), 3.75 (s, 3H), 4.65-4.82 (m, 1H), 6.25-6.55 (bd, 1H), 8.22 (s, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 22.1, 23.0, 25.1, 41.8, 49.6, 52.7, 161.1, 173.4.

7.4.1.3. (2*S*)-2-Izocyjano-4-metylopentanian metylu ((*S*)-105d):

Do roztworu związku otrzymanego powyżej, (1 g, 5.8 mmola) i *N*-metylmorfoliny (2.75 ml, 25 mmol) w dichlorometanie (10 ml) w temperaturze -40 °C, w atmosferze azotu, dodawano przez 1 godzin.

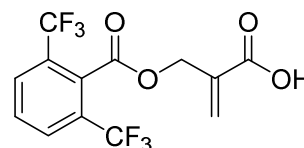


roztwor difosgenu (422 μl, 3.5 mmol) w dichlorometanie (5 ml). Mieszanie

kontynuowano przez kolejne 2 godziny w $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do mieszaniny reakcyjnej dodano wody (15 ml), fazy rozdzielono, faz. organiczną przemyto wodnym roztworem wodorowęglanu sodu (15 ml, 7.5%) i wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/ EtOAc , 97:3, obj:obj). Wydajność 57%; 516.8 mg lekko żółtego oleju; $R_f = 0.75$ (CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 0.98 (dd, $J_1 = 6.4\text{ Hz}$, $J_2 = 4.6\text{ Hz}$, 6H), 1.65-2.0 (m, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.29 (dd, $J_1 = 9.7\text{ Hz}$, $J_2 = 4.7\text{ Hz}$, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 21.2, 22.9, 25.1, 41.6, 53.6, 55.4, 167.9;

7.4.1.4. Związek 307. Kwas 2-(bromometylo)akrylowy

(350 mg, 2.1 mmola) rozpuszczono w chlorku metylenu (5 ml).



Dodano dihydropyran (DHP, 1,9 ml, 21 mmoli), i mieszano

przez 24 godz. Dodano chlorku metylenu (10 ml) i przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (10 ml) oraz solanką (10 ml). Fazę organiczną wysuszono siarczanem magnezu i odparowano rozpuszczalnik. Pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym układem heksan – eter dietylowy. Otrzymano 202 mg z wydajnością 38 %. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.47 - 1.97 (m, 6H), 3.72 - 3.75 (m, 1H), 3.89 - 4.01 (m, 1H), 4.18 (dd, $J_1 = 0.8$, $J_2 = 10.4\text{ Hz}$, 1H), 4.22 (dd, $J_1 = 0.8$, $J_2 = 10.4\text{ Hz}$, 1H), 5.99 (d, $J = 0.8\text{ Hz}$, 1H), 6.12 (t, $J = 2.6\text{ Hz}$, 1H), 6.41 (d, $J = 0.6\text{ Hz}$, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 18.7, 25.2, 29.4, 29.5, 63.5, 93.9, 130.0, 137.9, 163.8. Otrzymany związek (300 mg, 1,2 mmola) rozpuszczono w acetonie (5 ml) i dodano soli cezowej kwasu 2,6-bis-(trifluorometylo)benzoesowego (644 mg, 3.63 mmola). Mieszano przez 4 godz. w temperaturze pokojowej. Osad odsączono, aceton odparowano a pozostałość rozpuszczono w octanie etylu. Fazę organiczną przemyto wodorowęglanem sodu (15 ml) i solanką (10 ml). Wysuszono siarczanem sodu i odparowano rozpuszczalnik. Pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym układem heksan – eter dietylowy. Otrzymano 202 mg produktu z wydajnością 39 %. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.55 - 1.85 (m, 6H), 3.65 - 3.80 (m, 1H), 3.87 - 3.90 (m, 1H), 5.03 - 5.24 (m, 2H) 6.01 - 6.08 (m, 1H), 6.12 (d, $J=2.7\text{ Hz}$, 1H), 6.49 - 6.56 (m, 1H), 7.65 - 7.78 (m, 1H), 7.88 - 8.01 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 18.7, 25.2, 29.4, 63.5, 64.9, 93.7, 130.0, 130.2, 130.7, 134.6, 137.9, 163.8;

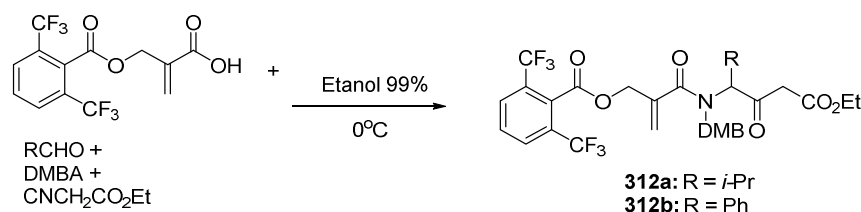
Otrzymany w ten sposób związek (67 mg, 0.16 mmola) rozpuszczono w układzie rozpuszczalników THF:kwas octowy:woda (4:2:1, obj:obj:v). Mieszano do zaniku substratu. Rozpuszczalniki odparowano i wysuszono na pompie olejowej. Osad

rekrytalizowano z układu heksan – octan etylu. Otrzymano 43 mg produktu z wydajnością 80%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 5.10 (s, 2H), 6.13, (s, 1H) 6.60 (s, 1H), 7,70 – 7.76 (m, 1H), 7.90 – 7.94 (m, 2H); ^{13}C NMR (50 Mhz, CDCl_3) δ 63.8, 128.3, 131.4, 131.6, 132.3, 133.4, 134.2, 164.5, 170.9; LR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczono dla: $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_6\text{O}_4\text{Na}$: 365.0, zbadana, 365.1 m/z , (ESI, $[\text{M}-\text{H}^+]$): obliczono dla: $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{F}_6\text{O}_4$: 341.2, zbadana: 341.2 m/z ;

7.4.2. Synteza peptydomimetyków

7.4.2.1. Synteza peptydomimetyków z wykorzystaniem kwasu 307.

7.4.2.1.1. Ogólna procedura wykonania reakcji Ugiiego z kwasem 307. Do roztworu aldehydu (1 mmol) w etanolu 99% dodano 2,4-dimetoksybenzyloaminę (1 równ.). Reakcję mieszano przez 30 min. Mieszaninę schłodzono do temperatury 0 °C. Dodano izocyjanooctan etylu (1 równ.) oraz kwas 307 (1 równ.). Reakcję prowadzono przez 2 godziny w temperaturze 0 °C a następnie przez 12 godzin w temperaturze pokojowej. Etanol odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, układ heksan – octan etylu).

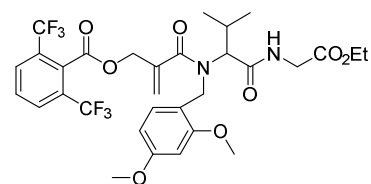


Schemat 58: Reakcja Ugiiego z kwasem 307

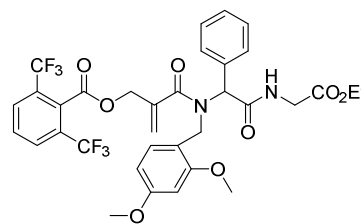
7.4.2.1.2. Związek 312a. Otrzymany według procedury ogólnej

7.4.2.1.1. Wydajność 36%, bezbarwny olej. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 0.80 (d, $J=6.5$ Hz, 3 H, $-\text{CH}_3$), 0.91 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.26 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 3.73 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$),

3.75 (s, 3 H, OCH_3), 3.83 (d, $J=5.5$ Hz, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 4.17 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.57 (m, 1H, $-\text{CH}-$), 4.91 - 5.16 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{OAr}$), 5.51 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.59 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.25 - 6.39 (m, 2H, ArH), 7.00 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, ArH), 7.65 - 7.79 (m, 1H, ArH), 7.85 - 7.98 (m, 3H, ArH, NH); LR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczono dla: $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}$: 699.6, zbadana, 699.7 m/z ;



7.4.2.1.3. Związek 312b. Otrzymany według procedury ogólnej 7.4.2.1.1. Wydajność 30 %, bezbarwny olej. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 3.58 (s, 2H, OCH_3), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.70 – 3.90 (m, 1H, $-\text{CHH}-$), 3.92 – 4.18 (m, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CHH}-$), 4.34 (d, $J = 18$ Hz, 1H, $-\text{CHH}-$), 4.64 (d, $J = 18$ Hz, $-\text{CHH}-$), 4.95 – 5.17 (m, 3H, $-(\text{Ph})\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-$), 5.54 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.57 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$) 6.21 - 6.35 (m, 3H, ArH), 7.12 – 7.35 (m, 5H, ArH), 7.58 – 7.70 (m, 1H, ArH), 7.78 – 7.87 (m, 2H, ArH); LR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczono dla: $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}$: 733.6, zbadana, 733.4 m/z ;

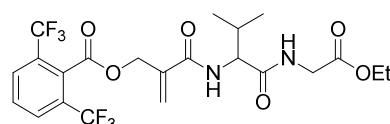


7.4.2.1.4. Ogólna procedura odbezpieczania związków 312a,b. Do roztworu związku **312a** lub **312b** w chlorku metylenu (0.1 mmol/1ml) dodano kwas trifluoroctowy (1:4, TFA:DCM, obj:obj). Roztwór zmieniał barwę z żółtej do fioletowej. Reakcję prowadzono do momentu całkowitego ubytku substratu. Roztwór rozdzieńczono chlorkiem metylenu, dodano roztwór wodorowęglanu sodu (nas.), stale wytrząsając, do momentu zaniku fioletowej barwy. Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (2x). Połączone fazy organiczne przemyto solanką a następnie wysuszono siarczanem magedzu. Chlorek metylenu odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym, układem heksan – octan etylu.;



Schemat 59. Odbezpieczanie związków **312a,b**

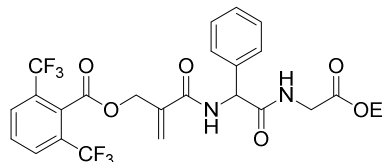
7.4.2.1.5. Związek 309b. Otrzymany według metody ogólnej 7.4.2.1.4. Wydajność 58 %, $R_f = 0.37$, (heksan – octan etylu, 5:5, obj:obj), ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ



0.78 – 1.05 (m, 6H, CH_3), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 2.02 – 2.21 (m, 1H), 3.89 (dd, $J=18.3$, 5.2 Hz, 1H, NHCHH), 4.05 – 4.16 (m, 1H, NHCHH), 4.18 (q, $J = 7.2$ Hz, CH_2CH_3), 4.42 (dd, $J_1 = 8.6$, $J_2 = 7.0$ Hz, 1H, $\text{CH}(i\text{-Pr})$), 5.11 (s, 2H, CH_2OAr), 5.80 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.01 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.77 (bd, $J = 8.7$ Hz, 1H, NH), 6.89 (bt, $J = 5.3$ Hz, 1H, NH), 7.64 - 7.79 (m, 1H, ArH) 7.84 - 7.98 (m, 2H, ArH); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ 14.4, 18.4, 19.4, 31.5, 41.6, 58.8, 61.8, 65.6, 123.8, 130.1, 130.2, 130.3, 130.6, 138.3,

166.4, 169.7, 171.5; Analiza elementarna obliczona dla: C₂₂H₂₄F₆N₂O₆: C, 50.19; H, 4.60; N, 5.32; zbadana: C, 50.39; H, 4.54; N, 5.19;

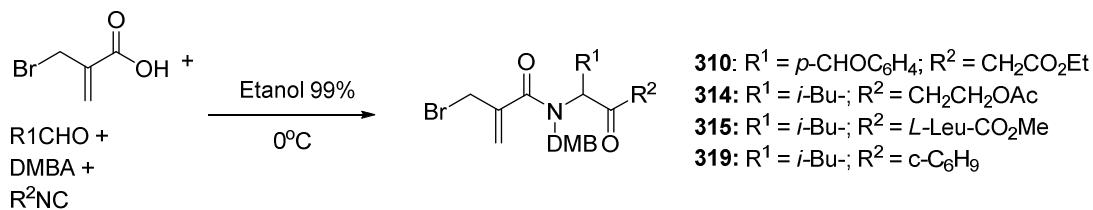
7.4.2.1.6. Związek 309g. Otrzymany według metody ogólnej 7.4.2.1.4. Wydajność 67%, białe ciało stałe; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 3.91 - 4.02 (m, 2H, -CH₂-), 4.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 5.10 (s, 2H, CH₂OAr), 5.56 - 5.66 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, -CH(Ph)-) 5.82 (s, 1 H, C=CHH) 6.04 (s, 1H, C=CHH) 6.54 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, NH) 7.22 - 7.48 (m, 6H, ArH, NH), 7.64 - 7.78 (m, 1H, ArH), 7.84 - 7.97 (m, 2H, ArH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.4, 41.9, 57.5, 62.0, 65.5, 123.8, 127.71, 128.9, 129.3, 130.0, 130.1, 130.2, 130.6, 137.6, 137.6, 138.0, 165.6, 165.7, 169.5, 170.19; Analiza elementarna obliczona dla: C₂₅H₂₂F₆N₂O₆·0,75H₂O: C, 52.32; H, 4.13; N, 4.88; zbadana: C, 52.05; H, 4.17; N, 4.62;



7.4.2.2. Synteza peptydomimetyków z wykorzystaniem kwasu 2-(bromometylo)akrylowego.

7.4.2.2.1. Ogólna procedura reakcji Ugiiego z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym.

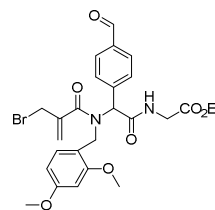
Do roztworu aldehydu (1 mmol) w etanolu 99% dodano 2,4-dimetoksybenzyloaminę (1 równ.). Reakcję mieszano przez 30 min. Mieszaninę schłodzono do temperatury 0 °C. Dodano izocyjanek (1 równ.) oraz kwas 2-(bromometylo)akrylowy (1 równ.). Reakcję prowadzono przez 2 godziny w temperaturze 0 °C a następnie przez 12-16 godzin w temperaturze 3 °C. Etanol odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, układ heksan – octan etylu).



Schemat 60. Reakcja Ugiiego z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym

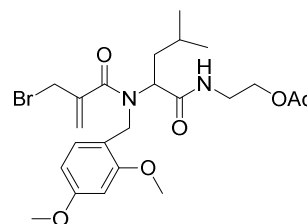
7.4.2.2.2. Związek 310. Otrzymany według procedury ogólnej 7.4.2.2.1. Wydajność 36%. bezbarwny olej. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.87 - 3.96 (m, 1H, -CHH-), 4.02 - 4.07 (m, 2H, CH₂), 4.15 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.11 - 4.18 (m, 1H, -CHH-), 4.40 - 4.56 (m, 2H,

CH_2), 4.84 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 5.51 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.55 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.30 - 6.37 (m, 1H, ArH), 6.40 - 6.54 (m, 2H, ArH), 7.44 (br. s., 1H, NH), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 9.97 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 14.4; 41.9, 55.4, 55.7; 61.8, 62.0, 64.6, 65.5, 98.7, 104.5, 116.3, 119.6, 130.0, 130.2, 136.4, 139.7, 141.6, 158.3, 161.0, 168.7, 169.8, 171.0, 171.6, 192.0;



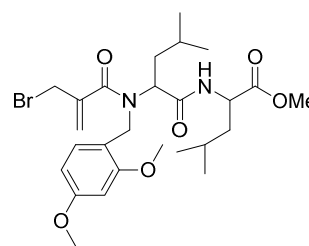
7.4.2.2.3. Związek 314. Otrzymany według procedury ogólnej

7.4.2.2.1. Wydajność 67%. bezbarwny olej. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.087 - 0.91 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.55 - 1.61 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.74 - 1.93 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.06 (s, 3H, OCOCH_3), 3.29 - 3.43 (m, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$), 3.78 (s, OCH_3), 3.79 (s, OCH_3), 4.03 - 4.05 (m, 1H, $-\text{CH}_2-$), 4.16 - 4.22 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.30 - 4.36 (m, 1H, $-\text{CH}(i\text{-Bu})-$), 4.55 - 4.69 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.38 (s, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.54 (s, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.41 - 6.44 (m, 2H, ArH), 7.10 - 7.19 (m, 2H, ArH , NH); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 21.2, 22.6, 23.0, 25.5, 33.5, 37.6, 38.5, 48.3, 55.5, 55.7, 59.5, 63.4, 98.8, 104.3, 116.8, 119.4, 130.1, 140.3, 158.3, 161.0, 171.2, 171.5, 171.7; HR-MS (ESI, $\text{M}+\text{Na}^+$) obliczona dla: $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6\text{BrNa}$: 535.1414, zbadana: 535.1404 m/z ; Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6\text{Br} + 0.33\text{H}_2\text{O}$: C, 53.18; H, 6.53; N, 5.39; zbadana: C, 53.20; H, 6.53; N, 5.48;

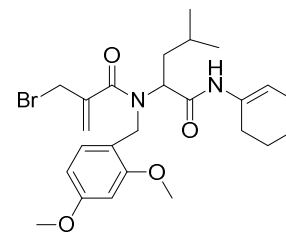


7.4.2.2.4. Związek 315. Otrzymany według procedury ogólnej

7.4.2.2.1. Wydajność 79%. bezbarwny olej. Związek otrzymany jako mieszanina diastereoizomerów w proporcji 1:1. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 - 0.95 (m, 24H), 1.46 - 1.60 (m, 8H), 1.73 - 1.85 (m, 2H), 1.96 - 2.07 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 4.19 - 4.29 (m, 6H), 4.42 - 4.48 (m, 2H,) 4.52 - 4.58 (m, 2H), 4.73 (s, 1H), 4.77 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.55 (s, 2H), 6.41 - 6.46 (m, 4H), 7.13 - 7.17 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 22.1, 22.8, 22.8, 22.9, 25.0, 25.0, 25.5, 25.5, 27.2, 33.4, 33.4, 41.5, 41.8, 50.9, 51.0, 52.3, 52.4, 55.6, 55.6, 98.8, 99.0, 104.4, 104.5, 116.9, 119.2, 130.3, 140.5, 158.4, 161.0, 161.1, 171.0, 171.1, 171.1, 171.2, 171.4, 171.4, 173.4;

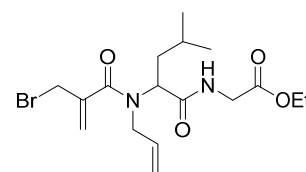


7.4.2.2.5. Związek 319. Otrzymany według zmodyfikowanej procedury ogólnej 7.4.2.2.1. Związek wytrącił się z mieszaniny reakcyjnej. Po reakcji, osad odsączono i przemyto układem heksan – octan etylu (8:2, obj:obj) do odmycia izocyjanku. Osad rekrytalizowano z układu heksan – octan etylu. Wydajność 45%,



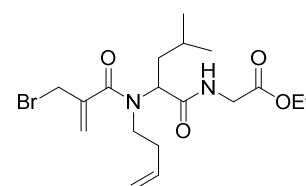
białe kryształy. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 - 0.94 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.47 - 1.58 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.59 - 1.69 (m, 3H, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.72 - 1.85 (m, 1 H, $-\text{CHHCH}(\text{CH}_3)_2$), 1.87 - 1.98 (m, 1 H, $-\text{CHHCH}(\text{CH}_3)_2$), 2.00 – 2.08 (m, 4 H, $2x-\text{CH}_2-$), 3.77 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.78 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.15 - 4.30 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$) 4.36 – 4.47 (m, 1H, $-\text{CH}(i\text{-Bu})-$) 4.62 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$) 5.40 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.56 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$) 5.90 (s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{C}-$), 6.33 - 6.52 (m, 2H, ArH) 7.08 – 7.11 (m, 1H, ArH) 7.88 (br. s., 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 22.4, 22.8, 23.0, 24.2, 25.5, 28.3, 33.3, 37.4, 48.4, 53.8, 55.5, 55.7, 60.0, 77.0, 77.4, 77.7, 78.6, 98.9, 104.4, 112.4, 116.6, 119.3, 119.7, 125.7, 130.3, 132.8, 140.4, 158.4, 161.0, 169.1, 172.0, 172.1; Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$: C, 59.17; H, 6.95; N, 5.52; zbadana: C, 59.39; H, 7.22; N, 5.37;

7.4.2.2.6. Związek 321a Do roztworu aldehydu izowalerianowego (258 μL , 3 mmole) w etanolu 99% (2 ml) dodano alliloaminę (225 μL , 3 mmole). Mieszaninę schłodzono do temperatury -78°C . Dodano izocyjanooctan etylu (327 μL , 3



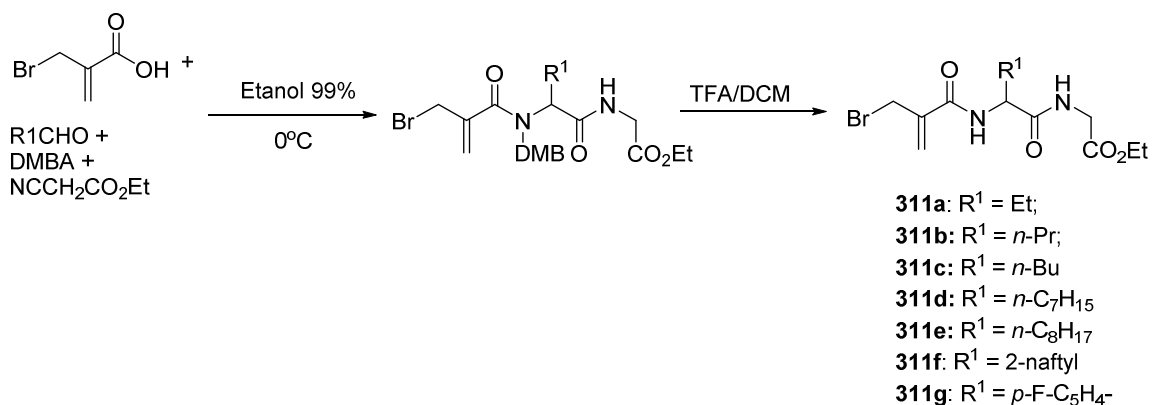
mmoli) oraz kwas 2-(bromometylo)akrylowy (494 mg, 3 mmole). Reakcję prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 0°C . Etanol odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, układ heksan – octan etylu). Otrzymano 385 mg produktu wydajnością 32%. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 0.92 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1.48 – 1.66 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.72 – 1.96 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CHMe}_2$), 3.95 – 3.99 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.12 – 4.24 (m, 6H, $3x-\text{CH}_2-$), 4.78 – 4.87 (m, 1H, $\text{CH}(i\text{-Bu})$), 5.15 – 5.24 (m, 2H, $\text{HC}=\text{CH}_2$), 5.35 (s, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.55 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.75 – 6.02 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.08 (bs, 1H, NH); HR-MS (ESI, $[\text{M}+\text{Na}^+]$) obliczona dla: $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{BrNa}$: 425,1046, zbadana: 425,1030 m/z ;

7.4.2.2.7. Związek 321b. Do roztworu aldehydu izowalerianowego (152 μL , 1.4 mmola) w chlorku metylenu dodano chlorowodorek but-3-enyloaminy (152 mg, 1.4 mmola), trietyloaminę (198 μL , 1.4 mmola) i siarczan magnezu (kat.). Reakcję mieszano



przez 18 godzin w temperaturze pokojowej. Odsączono siarczan magnezu i odparowano chlorek metylenu. Pozostałość rozpuszczono w etanolu 99% (1.5 ml). Mieszaninę schłodzono do temperatury 0 °C. Dodano izocyjanooctan etylu (155 µL, 1.4 mmola) oraz kwas 2-(bromometylo)akrylowy (233 mg, 1.4 mmola). Reakcję prowadzono przez 2 godziny w temperaturze 0 °C. Etanol odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, układ heksan – octan etylu). Otrzymano 201 mg produktu z wydajnością 34%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.89 – 0.95 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 1.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, -OCH₂CH₃), 1.42 – 1.62 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.28 – 2.46 (m, 2H, -CH₂CHMe₂), 3.40 – 3.64 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 3.87 – 4.11 (m, 2H, -NCH₂All), 4.16 (q, 2H, OCH₂CH₃), 4.21 (s, 2H, -CH₂-), 4.82 – 4.90 (m, 1H, -CH(i-Bu)-), 4.98 – 5.07 (m, 2H, CH=CH₂), 5.32 (s, C=CHH), 5.56 (s, 1H, C=CHH), 5.62 – 5.72 (m, 1H, CH=CH₂); 7.27 (bs, 1H NH), ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.4, 22.4, 23.1, 25.2, 33.3, 34.0, 36.6, 41.6, 47.5, 56.8, 61.6, 117.5, 118.7, 134.5, 140.6, 169.7, 171.4, 171.8; HR-MS (ESI, [M+Na⁺]) obliczona dla: C₁₈H₂₉N₂O₄BrNa: 439.1203, zbadana: 439.1212 *m/z*;

7.4.2.2.8. Ogólna procedura reakcji Ugiego z kwasem 2-(bromometylo)akrylowym i następczej reakcji odbezpieczania. Do roztworu aldehydu (1 mmol) w etanolu 99% dodano 2,4-dimetoksybenzyloaminę (1 równ.). Reakcję mieszano przez 30 min. Mieszaninę schłodzono do temperatury 0 °C. Dodano izocyjanek (1 równ.) oraz kwas 2-(bromometylo)akrylowy (1 równ.). Reakcję prowadzono przez 2 godziny w temperaturze 0 °C. Etanol odparowano. Pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i przesączono przez żel krzemionkowy. Żel przemyto układem heksan – octan etylu (1:1, obj:obj). Rozpuszczalniki odparowano. Pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu (0.1mmol/1ml) i dodano kwas trifluorooctowy (1:4, TFA:DCM, obj:obj). Mieszano do momentu całkowitego ubytku substratu. Roztwór rozdzieńczono chlorkiem metylenu, a następnie dodawano roztwór wodorowęglanu sodu (nas) do momentu zaniku fioletowej barwy. Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu. Połączone fazy organiczne przemyto solanką a następnie wysuszono siarczanem magedzu. Chlorek metylenu odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym, układem heksan – octan etylu.



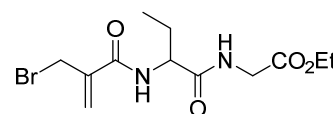
Schemat 61. Reakcja Ugiego z następczą reakcją usunięcia grupy DMB.

7.4.2.2.9. Związek 311a. Otrzymany według procedury

ogólnej 7.4.2.2.8. Wydajność całkowita dwóch etapów: 23%.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃),

1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.59 - 1.84 (m, 1H, CHHCH₃), 1.84 - 2.11 (m, 1H, CHHCH₃), 3.97 (dd, *J*₁ = 18.4 Hz, *J*₂ = 5.2 Hz, 1H, -CHH), 4.12 (dd, *J*₁ = 18.4, *J*₂ = 5.6 Hz, 1H), 4.18 - 4.27 (m, 4H, 2x-CH₂-), 4.51 - 4.66 (m, 1H, CH(Et)), 5.72 (s, 1H, C=CHH), 5.85 (s, 1H, C=CHH) 6.73 - 6.93 (m, 2H, 2xNH), ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 10.1, 14.5, 26.1, 30.6, 41.7, 54.7, 61.9, 123.0, 141.4, 166.3, 169.8, 171.9, 220.0;

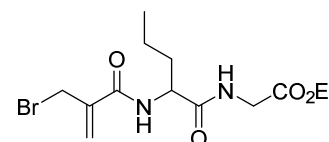


7.4.2.2.10. Związek 311b. Otrzymany według procedury ogóln

ej 7.4.2.2.8. Wydajność całkowita dwóch etapów: 19%. ¹H

NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃),

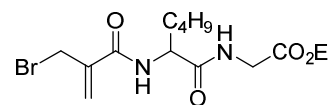
1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.38 - 1.46 (m, 2H, -CH₂CH₃), 1.65 - 1.74 (m, 1H, -CHHCH₂-), 1.84 - 1.91 (m, 1H, -CHHCH₂-), 3.97 (dd, *J*₁ = 5 Hz, *J* = 18 Hz, 1H, -CHH-), 4.01 (dd, , *J*₁ = 6 Hz, *J* = 18 Hz, 1H, -CHH-), 4.17 - 4.24 (m, 4H, 2x-CH₂-), 4.64 - 4.69 (m, 1H, -CH(C₃H₇-)) 5.72 (s, 1H, C=CHH), 5.87 (s, 1H, C=CHH), 6.91 (bd, *J* = 8Hz, 1H, NH), 7.09 (bt, *J* = 5 Hz, NH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.1, 14.4, 19.0, 30.7, 34.9, 41.7, 53.4, 61.8, 123.0, 141.3, 166.3, 169.9, 172.2;



7.4.2.2.11. Związek 311c. Otrzymany według procedury

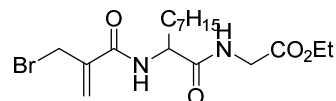
ogólnej 7.4.2.2.8. Wydajność całkowita dwóch etapów: 16%,

bezbarwny olej. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.84 - 0.91 (m, 3H, CH₃), 1.22 - 1.40 (m, 7H, -C₂H₄-; OCH₂CH₃), 1.57 - 1.79 (m, 1H, CHH(C₃H₇)), 1.80 - 2.02 (m, 1H, CHH(C₃H₇)), 3.89 - 4.14 (m, 2H, NHCH₂), 4.14 - 4.26 (m, 2H, 2xCH₂), 4.56 - 4.67 (m,



1H, -CH(*n*-Bu-), 5.71 (s, 1H, C=CHH), 5.85 (s, 1H, C=CHH), 6.78 (bd, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 6.92 (bt, *J* = 5.1 Hz, 1H, NHCH₂), ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 14.2, 14.5, 22.7, 27.8, 30.7, 32.5, 41.7, 53.6, 61.9, 76.7, 77.4, 78.0, 123.0, 141.4, 166.2, 169.8, 172.1;

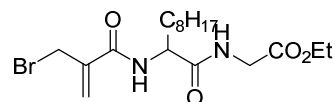
7.4.2.2.12. Związek 311d. Otrzymany według procedury ogólnej 7.4.2.2.8. Wydajność całkowita dwóch etapów: 14 %.



¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.73 - 0.98 (m, 3H, CH₃), 1.14 -

1.46 (m, 13H, -(CH₂)₅-; OCH₂CH₃), 1.55 - 1.78 (m, 1H, CHH(C₆H₁₃)), 1.80 - 2.01 (m, 1H, CHH(C₆H₁₃)), 3.89 - 4.14 (m, 2H, NHCH₂), 4.14 - 4.30 (m, 4H, 2xCH₂), 4.52 - 4.68 (m, 1H, -CH(C₇H₁₅-), 5.71 (s, 1H, C=CHH), 5.84 (s, 1H, C=CHH), 6.75 (bd, *J* = 8.1 Hz, NH) 6.86 (t, *J*=5.2 Hz, 1H, NHCH₂) ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 14.2, 14.4, 14.5, 22.9, 25.7, 29.4, 29.6, 30.7, 32.0, 32.8, 41.7, 53.6, 61.9, 122.9, 141.4, 166.3, 169.8, 172.1;

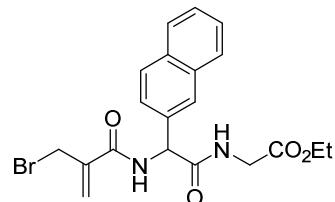
7.4.2.2.13. Związek 311e. Otrzymany według procedury ogólnej 7.4.2.2.1. Wydajność całkowita dwóch etapów: 12%.



bezbardwy olej. ¹H NMR (400 MHz, CHCl₃): δ 0.85 (t, *J* = 7.2

Hz, 3H, -(CH₂)₇CH₃), 1.21 - 1.34 (m, 15H, -CH₂(CH₂)₆CH₃, -OCH₂CH₃), 1.64-1.72 (m, 1H, CHH(CH₂)₆-), 1.84 - 1.91 (m, 1H, CHH(CH₂)₆-), 3.96 (dd, *J*₁ = 18 Hz, *J*₂ = 5.2 Hz, 1H, -CHH-), 4.07 (dd, *J*₁ = 18 Hz, *J*₂ = 5.2 Hz, 1H, -CHH-), 4.12 - 4.22 (m, 4H, 2x-CH₂-), 4.61 - 4.66 (m, 1H, -CH(C₈H₁₇-), 5.70 (s, 1H, C=CHH), 5.8 (s, 1H, C=CHH), 6.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, -NHCH(C₈H₁₇-), 7.09 (t, *J* = 5.6 Hz, NH) ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.4, 14.4, 23.0, 25.7, 29.5, 29.6, 29.7, 30.7, 32.1, 32.9, 41.7, 53.6, 61.8, 77.0, 77.4, 77.7, 122.9, 141.3, 166.2, 169.8, 172.2;

7.4.2.2.14. Związek 311f. Otrzymany według procedury ogólnej 7.4.2.2.8. Wydajność całkowita dwóch etapów: 14% .



¹H NMR (400 MHz, CHCl₃): δ 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃),

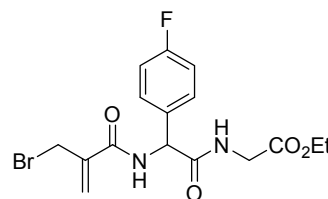
3.96 (m, 2H, CH₂), 4.07 - 4.22 (m, 4H, 2xCH₂), 5.72 (s, 1H, C=CHH), 5.88 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, -CH(Ar-), 5.92 (s, 1H, C=CHH) 6.87 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, -NHCH₂-), 7.42 - 7.54 (m, 3H, ArH) 7.61 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, NH), 7.72 - 7.82 (m, 3H, ArH), 7.93 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3, 30.4, 41.9, 57.6, 61.9, 123.6, 124.8, 126.7, 127.3, 128.0, 129.3, 133.5, 133.5, 135.0, 141.0, 165.7, 169.5, 170.3;

7.4.2.2.15. Związek 311g. Otrzymany według procedury ogólnej 7.4.2.2.8. Wydajność całkowita dwóch etapów: 17%, białe ciało stałe.

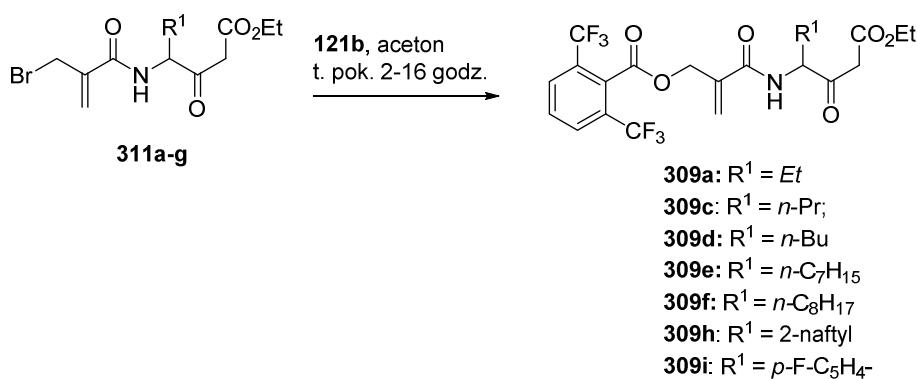
^1H NMR (400 MHz, CHCl_3): δ 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 4.00 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.13 - 4.23

(m, 4H, $2x-\text{CH}_2-$), 5.67 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, $-\text{CH}(\text{Ar})-$), 5.75 (s, 1 H, $\text{C}=\text{CHH}$), 5.90 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.74 (bt, $J = 4.9$ Hz, 1H, $-\text{NHCH}_2-$), 6.99 - 7.06 (m, 2H, ArH) 7.39 - 7.50 (m, 3H, ArH, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 14.4, 30.4, 41.9, 56.7, 62.0, 116.2, 120.6, 123.7, 129.5, 129.6, 133.5, 141.0, 161.8, 165.7, 169.5, 170.1; HR-MS (ESI, $\text{M}+\text{Na}^+$) obliczona dla: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{FBrNa}$: 423.0326, zbadana: 423.0332 m/z ;



7.4.2.2.16. Ogólna procedura estryfikacji peptydomimetyków 311a-g z usuniętą grupą dimetoksybenzylową. Substrat rozpuszczono w acetonie (0,05 mmol substratu/ml). Dodano sól cesową kwasu 2,6-bis-(trifluorometylo)benzoesowego (3 równ.). Mieszano od 2 – 16 godzin, w zależności od substratu, do całkowitej konwersji. Aceton odparowano, a pozostałość rozpuszczono w mieszaninie dwufazowej octan etylu – nasycony węglan sodu. Fazę organiczną przemyto dodatkowo porcją wodorowęglanu sodu, solanką a następnie siarczanem magnezu. Octan etylu odparowano i oczyszczono pozostałość na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym, układem heksan – octan etylu.

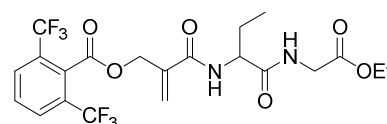


Schemat 62. Estryfikacja związków 311a-g

7.4.2.2.17. Związek 309a. Otrzymano według metody ogólnej 7.4.2.2.16. Wydajność 42%, $R_f = 0.39$,

(toluen:octan etylu, 3:2, obj:obj). ^1H NMR (400 MHz,

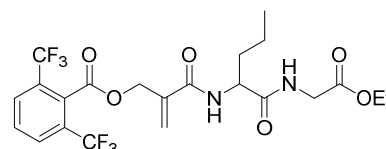
CDCl_3): δ 0.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 1.66 – 1.76 (m, 1H, CHHCH_3), 1.89 – 1.97 (m, 1H, CHHCH_3), 3.95 (dd, $J_1 = 5.0$ Hz; $J_2 = 18.2$ Hz, 1H, NHCHH), 4.08 (dd, $J_1 = 5.8$ Hz; $J_2 = 18.2$ Hz, 1H, NHCHH), 4.16 (q, $J = 7.2$ Hz, CH_2CH_3), 4.56 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz; $J_2 = 14.4$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{Et})$), 5.12 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H,



ArOCH₂), 5.82 (s, 1H, C=CHH), 6.03 (s, 1H, C=CHH), 6.81 (bd, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 7.00 (bt, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 7.72 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 9.9; 14.4; 25.9; 41.6; 54.6; 61.8; 65.6; 121.7; 124.1; 129.1; 129.5; 130.2; 130.7; 138.1; 164.9; 166.3; 169.8; 172.0; Analiza elementarna obliczona dla: C₂₁H₂₂F₆N₂O₆: C, 49.22; H, 4.33; N, 5.47; zbadana: C, 49.20; H, 4.57; N, 5.22;

7.4.2.2.18. Związek 309c. Otrzymano według metody

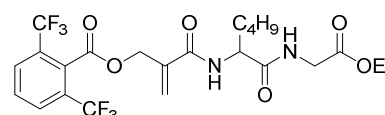
ogólnej 7.4.2.2.16. Wydajność 69%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.87 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, (CH₂)₂CH₃), 1.27 (t, *J* = 3.6 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.29 – 1.40 (m, 2H, CH₂CH₃),



1.60 – 1.69 (m, 1H, CHH(Et)), 1.80 – 1.89 (m, 1H, CHH(Et)), 3.94 (dd, *J*₁ = 18 Hz; *J*₂ = 5.2 Hz, 1H, NHCHH), 4.07 (dd, *J*₁ = 18 Hz; *J*₂ = 5.6 Hz, 1H, NHCHH), 4.19 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.62 (dd, *J*₁ = 14 Hz; *J*₂ = 7.6 Hz, 1H, CH(Pr)), 5.07 – 5.15 (m, 2H, ArOCH₂), 5.81 (s, 1H, C=CHH), 6.03 (s, 1H, C=CHH), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 7.04 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 7.72 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.92 (d, *J* = 8 Hz, 2H, ArH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 13.6; 14.0; 18.6; 34.4; 41.2; 52.9; 61.4; 65.2; 121.3; 123.7; 124.1; 128.8; 129.1; 129.8; 130.3; 137.7; 164.5; 165.9; 169.4; 171.8; Analiza elementarna obliczona dla: C₂₂H₂₄F₆N₂O₆: C, 50.19; H, 4.60; N, 5.32; zbadana: C, 50.40; H, 4.86; N, 5.21;

7.4.2.2.19. Związek 309d. Otrzymano według metody

ogólnej 7.4.2.2.16. Wydajność 42%. ¹H NMR (500 Mhz, CDCl₃): δ 0.83 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H; CH₂CH₂CH₃), 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H; OCH₂CH₃), 1.28 – 1.30 (m, 4H; CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.63 – 1.70 (m, 1H;

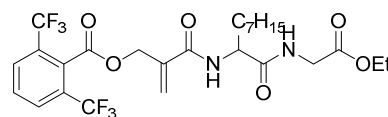


CHHC₃H₇), 1.85 – 1.91 (m, 1H; CHHC₃H₇), 3.96 (dd, *J*₁ = 5.2 Hz, *J*₂ = 18.1 Hz, 1H, -NHCHHCOOEt), 4.06 (dd, *J*₁ = 5.6 Hz, *J*₂ = 18.1 Hz, 1H, -NHCHHCOOEt), 4.20 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H; OCH₂CH₃), 4.56 (dd, *J*₁ = 7.6 Hz, *J*₂ = 13.9 Hz, 1H, -NHCH(C₄H₉)CO-), 5.09 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H, -OCHHHC(=CH₂)-), 5.14 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H, -OCHHHC(=CH₂)-), 5.82 (s, 1H, -C(=CHH)-) 6.03 (s, 1H, -C(=CHH)-), 6.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, -CONHCH(C₄H₉)-), 6.80 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, CONHCH₂COOEt), 7.71 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, p-Aryl), 7.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, m-aryl); ¹³C NMR (125 Mhz, CDCl₃): δ 13.7; 14.1; 22.3; 27.4; 32.0; 41.3; 53.1; 61.5; 65.3; 121.7; 123.8; 123.9; 126.0; 128.6; 128.9; 129.1; 129.4; 129.8; 129.8; 130.1; 130.3; 137.8; 164.5; 165.9; 169.4; 171.7; Analiza elementarna

obliczona dla: C₂₃H₂₆F₆N₂O₆: C, 51.11; H, 4.85; N, 5.18; zbadana: C, 51.36; N, 4.96; N, 5.19;

7.4.2.2.20. Związek 309e. Otrzymano według metody

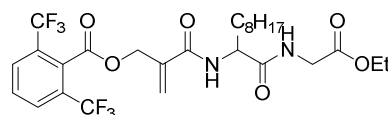
ogólnej 7.4.2.2.16: Wydajność 54%. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, -C₆H₁₂CH₃), 1.22 – 1.28



(m, 12H, -CH₂(CH₂)₅CH₃), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, -OCH₂CH₃), 1.61 – 1.69 (m, 1H, -CHHC₆H₁₂), 1.85 – 1.93 (m, 1H, -CHHC₆H₁₂), 3.97 (dd, *J*₁ = 5.1 Hz; *J*₂ = 18.3Hz, 1H, -NHCHHCO-), 4.05 (dd, *J*₁ = 5.5 Hz; *J*₂ = 18.3Hz, 1H, -NHCHHCO-), 4.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, -OCH₂CH₃), 4.50 (q, *J* = 6,45 Hz, 1H, -NHCH(C₈H₁₇)CONH-), 5.12 (s, 2H, -OCH₂C(=CH₂)-), 5.82 (s, 1H, -OCH₂C(=CHH)-), 6.03 (s, 1H, -OCH₂C(=CHH)-), 6.55 (d, *J* = 7,87 Hz, 1H, -NHCH(C₈H₁₇)CONH-), 6.58 (t, *J* = 5,0 Hz, 1H, -CONHCH₂-), 7.71 (t, *J* = 7,76 Hz, 1H, p-aryl), 7.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, m-aryl); ¹³C NMR (120 MHz, CDCl₃): δ 14.1, 14.1, 22.6, 25.4, 29.0, 29.2, 31.7, 32.2, 41.3, 53.2, 61.5, 65.3, 121.7, 123.8, 124.0, 128.9, 129.1, 129.4, 129.8, 13.1, 130.3, 137.8, 164.5, 165.9, 169.4, 171.6; Analiza elementarna obliczona dla: C₂₆H₃₂F₆N₂O₆: C, 53.61; H, 5.54; N, 4.81; zbadana: C, 53.39; H, 5.78; N, 4.65;

7.4.2.2.21. Związek 309f. Otrzymano według metody

ogólnej 7.4.2.2.16: Wydajność 54%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, -C₇H₁₅CH₃), 1.19 –



1.36 (m, 12H, -CH₂(CH₂)₆CH₃), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, -OCH₂CH₃), 1.61 – 1.71 (m, 1H, -CHHC₇H₁₅), 1.82 – 1.91 (m, 1H, -CHHC₇H₁₅), 3.95 (dd, *J*₁ = 5.2 Hz; *J*₂ = 18.0Hz, 1H, -NHCHHCO-), 4.06 (dd, *J*₁ = 5.6 Hz; *J*₂ = 18.0Hz, 1H, -NHCHHCO-), 4.19 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, -OCH₂CH₃), 4.60 (dd, *J*₁ = 7.2 Hz; *J*₂ = 18.0Hz, 1H, -NHCH(C₈H₁₇)CONH-), 5.08 (d, *J* = 13.2 Hz; 1H, -OCHHC(=CH₂)-), 5.15 (d, *J* = 13.2 Hz; 1H, -OCHHC(=CH₂)-), 5.81 (s, 1H, -OCH₂C(=CHH)-), 6.03 (s, 1H, -OCH₂C(=CHH)-), 6.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, -NHCH(C₈H₁₇)CONH-), 7.40 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, -CONHCH₂-), 7.20 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, p-aryl), 7.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, m-aryl). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.4, 22.9, 25.7, 29.5, 29.6, 32.1, 33.0, 41.6, 53.5, 61.8, 121.7, 124.0, 124.4, 129.1, 129.5, 130.2, 130.2, 130.5, 130.7, 138.1, 164.8, 166.3, 169.8, 172.2 Analiza elementarna obliczona dla: C₂₇H₃₄F₆N₂O₆: C, 54.36; H, 5.74; N, 4.70; zbadana: C, 54.25; H, 5.50; N, 4.54;

7.4.2.2.22. Związek 309h. Otrzymano według

metody ogólnej 7.4.2.2.16. Wydajność 62%, $R_f = 0.23$

(toluen:octan etylu, 5:5, obj:obj); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,

CDCl_3): δ 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 3.93 (dd, J_1

$= 18.2$, $J_2 = 5.3$ Hz, 1H, NHCHH), 4.00 (dd, $J_1 = 18.2$, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, NHCHH), 4.12 (q,

$J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 5.10 (s, 2H, CH_2OAr), 5.78 - 5.88 (m, 2H, C=CHH ; CH), 6.06

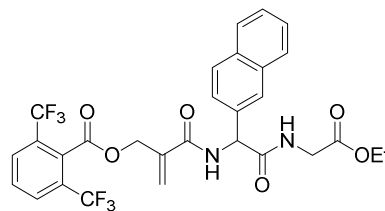
(s, 1H, C=CHH), 6.71 (bt, $J = 5.2$ Hz, 1H, NH), 7.38 - 7.56 (m, 4H, ArH , NH), 7.61 - 7.82

(m, 4H, ArH), 7.82 - 7.95 (m, 3H, ArH); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 14.3, 41.9, 57,

61.9, 65.5, 123.9, 124.8, 126.7, 127.3, 127.9, 128.4, 129.1, 129.3, 130.1, 130.6, 133.4,

133.5, 135.0, 137.9, 167.8, 169.5, 170.3; HR-MS (ESI, $\text{M}+\text{Na}^+$) obliczona dla:

$\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{F}_6\text{Na}$: 633.1431, zbadana: 633.1454 m/z ;



7.4.2.2.23. Związek 309i. Otrzymano według metody

ogólnej 7.4.2.2.16. Wydajność 32%; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz,

CDCl_3): δ 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 4.00 (d,

$J = 5.0$ Hz, 2H, $-\text{CONHCH}_2\text{COOEt}$), 4.18 (q, $J = 7.1$ Hz,

2H, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 5.10 (s, 2H, $-\text{COOCH}_2\text{C(=CH}_2\text{)-}$), 5.57 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, -

$\text{CONHCH(p-F-fenyl)CO-}$), 5.83 (s, 1H, $-\text{OCH}_2\text{C(=CHH)-}$), 6.04 (s, 1H, $-\text{OCH}_2\text{C(=CHH)-}$),

6.35 (bt, $J = 4.9$ Hz, 1H, $-\text{CONHCH}_2\text{-}$), 6.98 - 7.02 (m, 2H, arylH), 7.31 (d, $J = 6.2$ Hz,

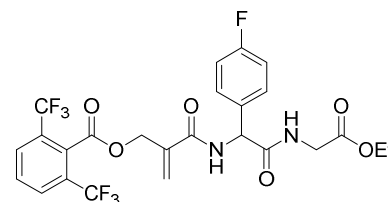
1H, $-\text{CONHCH(p-F-Ph)CO-}$), 7.71 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, aryl), 7.90 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, aryl).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 14.1; 41.6; 56.4; 61.7; 65.1; 115.9; 116.1; 119.4; 121.6;

123.8; 123.9; 126.0; 128.6; 128.9; 129.2; 129.3; 129.4; 129.4; 129.8; 129.9; 130.1; 130.3;

161.7; 163.7; 164.4; 165.4; 169.1; 169.7; Analiza elementarna obliczona dla:

$\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{F}_7\text{N}_2\text{O}_6$: C, 51.91; H, 3.66; N, 4.84; zbadana: C, 52.04; H, 3.86; N, 4.61;



7.4.2.2.24. Ogólna procedura odbezpieczania peptydomimetyków z następczą

reakcją podstawienia. Substraty rozpuszczono w chlorku metylenu (0.1 mmol/1ml) i

dodano kwas trifluoroctowy (1:4, TFA:DCM, obj:obj). Mieszano do momentu

całkowitego ubytku substratu. Roztwór rozdzieńczono chlorkiem metylenu, a następnie

dodawano roztwór wodorowęglanu sodu (nas) do momentu zaniku fioletowej barwy. Fazę

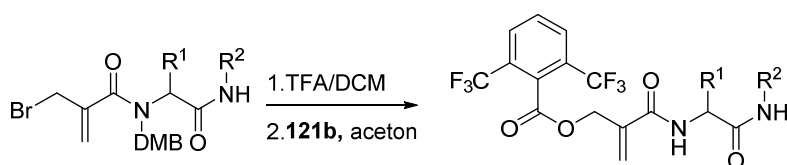
wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu. Połączone fazy organiczne przemyto solanką a

następnie wysuszono siarczanem magedu. Chlorek metylenu odparowano. Pozostałość

niezwłocznie rozpuszczono w acetonie (związek przechowywany w tej postaci ulegał

rozkładowi) (0,05 mmol substratu/ml). Dodano sól cezową kwasu 2,6-bis-

(trifluorometylo)benzoesowego (3 równ.). Mieszano od 4 do 16 godzin, w zależności od substratu, do pełnej jego konwersji. Aceton odparowano, a pozostałość rozpuszczono w mieszaninie dwufazowej octan etylu – nasycony węglan sodu. Fazę organiczną przemyto dodatkowo porcją wodorowęglanu sodu, solanką a następnie siarczanem magnezu. Octan etylu odparowano i oczyszczono pozostałość na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym, układem heksan – octan etylu.



309j: R¹ = *p*-(CHO)-C₆H₄-; R² = -CH₂CO₂Et

316: R¹ = *i*-Bu; R² = -CH₂CH₂OAc

318: R¹ = *i*-Bu; R² = -L-Leu-CO₂Me

320: R¹ = *i*-Bu; R² = -H

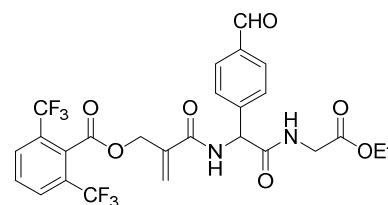
Schemat 63. Ogólna metoda reakcji odbezpieczania i następczej reakcji podstawienia solą cezową **121b**

7.4.2.2.25. Związek 309j.

Otrzymany według metody ogólnej 7.4.2.2.24, Wydajność całkowita po dwóch

etapach: 57%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.21 (t, *J* = 7.2 Hz; 3H, -OCH₂CH₃), 3.98 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂),

4.15 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, -OCH₂CH₃), 5.08 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, CHH), 5.13 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, CHH), 5.84 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, NHCH(*p*-OHC-fenyl) -), 5.86 (s, 1H, C=CHH), 6.08 (s, 1H, C=CHH), 7.04 (bt, *J* = 5.6 Hz, 1H, -CONHCH₂-), 7.53 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, NH), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.69- 7.76 (m, 3H, ArH), 7.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH), 9.94 (s, 1H, -CHO); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3, 41.9; 57.0; 62.0; 65.4; 121.7; 124.4; 124.7; 128.2; 129.1; 129.4; 129.8; 130.2; 130.5; 130.7; 136.5; 137.8; 144.2; 164.8; 165.9; 169.5; 192.0; Analiza elementarna obliczona dla: C₂₆H₂₂F₆N₂O₇: C, 53.07; H, 3.77; N, 4.76; zbadana: C, 53.04; H, 3.91; N, 4.57;



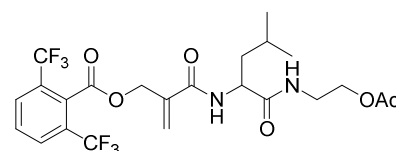
7.4.2.2.26. Związek 316.

Otrzymany według metody ogólnej 7.4.2.2.24. Wydajność całkowita po dwóch

etapach: 91%; R_f = 0,68 (toluen:octan etylu 6:4, obj:obj).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.85 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H, -

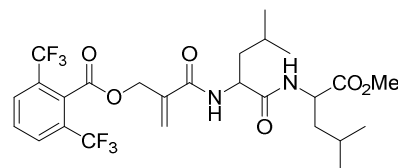
CH(CH₃)₂), 1.50 - 1.67 (m, 3H, -CH₂CH(CH₃)₂), 2.02 (s, 3H, -OOCCH₃), 3.37 - 3.44 (m, 1H, -NHCHHCH₂O-), 3.45 - 3.55 (m, 1H, -NHCHHCH₂O-), 4.02 - 4.12 (m, 2H, -NHCH₂CH₂O-), 4.50 (m, 1H, -CONHCH(*i*-Bu)-), 5.01 (s, 2H, -COOCH₂C(=CH₂)-), 5.80



(s, 1H, C=CHH), 6.04 (s, 1H, C=CHH), 6.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, -CONHCH(*i*-Bu)-), 6.90 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, -CONHCH₂-), 6.90 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, *p*-aryl), 7.91 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, *m*-aryl); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.1, 22.4, 23.0, 25.0, 38.9, 41.1, 52.1, 63.1, 65.6, 124.4, 124.5, 129.1, 129.4, 130.2, 130.7, 137.9, 164.8, 166.4, 171.4, 172.4 Analiza elementarna obliczona dla: C₂₃H₂₆F₆N₂O₆: C, 51.11; H, 4.85; N, 5.18; zbadana: C, 51.03; H, 4.82; N, 5.06;

7.4.2.2.27. Związek 318. Otrzymany według metody

ogólnej 7.4.2.2.24. Wydajność całkowita po dwóch etapach: 95%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

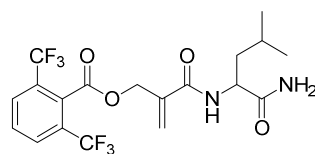


Diastereoizomer 1: δ 0.84 – 0.86 (m, 12H 4x-CH(CH₃)₂),

1.49 - 1.70 (m, 6H, 2x -CH₂CH(Me)₂), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 4.46 - 4.66 (m, 2H, 2x-CH(*i*-Bu)-), 4.98 - 5.19 (m, 2H, -CH₂OAr), 5.78 (s, 1 H, C=CHH), 6.01 (s, 1H, C=CHH), 6.69 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 6.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 7.63 - 7.78 (m, 1H, ArH), 7.89 – 7.91 (m, 2H, ArH) Diastereoizomer 2: δ 0.86 – 0.92 (m, 12H 4x-CH(CH₃)₂), 1.50 - 1.68 (m, 6H, 2x -CH₂CH(Me)₂), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 4.51 - 4.63 (m, 2H, 2x-CH(*i*-Bu)-), 5.06 – 5.16 (m, 2H, -CH₂OAr), 5.79 (s, 1 H, C=CHH), 6.01 (s, 1H, C=CHH), 6.63 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 6.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 7.69 - 7.73 (m, 1H, ArH), 7.90 – 7.92 (m, 2H, ArH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): Mieszanina diastereoizomerów: δ 11 22.0, 22.4, 22.4, 23.0, 23.0, 23.1, 24.9, 25.1, 25.2, 41.2, 41.4, 41.5, 51.1, 51.9, 52.5, 65.5, 65.6, 121.7, 124.0, 124.0, 124.4, 127.2, 129.2, 129.5, 130.2, 130.2, 130.4, 130.7, 138.0, 138.0, 164.8, 166.3, 166.5, 172.0, 172.1, 173.3 Analiza elementarna obliczona dla: C₂₆H₃₂F₆N₂O₆: C, 53.61; H, 5.54; N, 4.81; zbadana: C, 53.45; H, 5.54; N, 4.62;

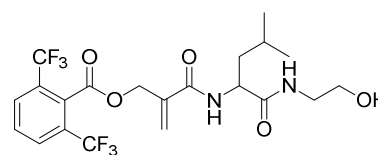
7.4.2.2.28. Związek 320. Otrzymany według procedury

ogólnej ogólnej 7.4.2.2.24. Wydajność całkowita po dwóch etapach: 24 %; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.88 (d, $J = 6.0$



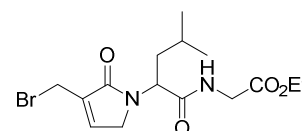
Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 0.88 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.53 - 1.72 (m, 3H, CH₂CH(Me)₂), 4.57 - 4.66 (m, 1H, -CH(*i*Bu)-), 5.10 (s, 2H, -CH₂OAr), 5.82 (s, 1H, C=CHH), 6.05 (s, 1H, C=CHH), 6.10 (bs, 1H, NHH), 6.66 (bs, 1H, NHH), 6.83 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 7.61 - 7.81 (m, 1H, ArH), 7.91 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 22.4, 23.1, 25.1, 41.2, 51.6, 65.7, 77.0, 77.4, 77.6, 77.7, 121.7, 124.5, 124.8, 129.2, 129.5, 130.3, 130.7, 137.9, 164.9, 166.4, 174.5; HR-MS (ESI, [M+Na⁺]) obliczono dla: C₁₉H₂₀N₂O₄NaBr: 477.1220, zbadana: 477.1226 *m/z*;

7.4.2.2.29. Związek 317. Roztwór związku **316** (58 mg, 0.1 mmol) w metanolu (1,2 ml) chłodzono do temperatury 0 °C. Dodano wodny roztwór węglanu potasu (2N, 64 µl) i reakcję prowadzono przez 15 min.



Odparowano metanol a pozostałość rozpuszczono w DCM (10 ml). Faza organiczna została przemyta solanką (3 ml) i wysuszona siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano a pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej. (żel krzemionkowy, $R_f = 0.12$, 5:5, obj:obj). Otrzymano 51 mg produktu z wydajnością 95%. ^1H NMR (500 Mhz, CDCl_3): δ 0.89 (d, $J = 1.5$ Hz, 3H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$), 0.91 (d, $J = 1.5$ Hz, 3H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$) 1.54 – 1.65 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.69 – 1.75 (m, 1H), 1.92 (bs, 1H, $-\text{OH}$), 3.34 – 3.45 (m, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.66 – 3.70 (m, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) 4.45 – 4.51 (m, 1H, $-\text{NHCH}(i\text{-Bu})\text{CO}-$), 5.11 (s, 2H, $-\text{COOCH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)-$), 5.83 (s, 1H, $=\text{CHH}$), 6.05 (s, 1H, $=\text{CHH}$). 6.47 (d, $J = 7.8$ Hz, $-\text{CNHCH}(i\text{-Bu})-$), 6.67 (bs, 1H, $-\text{CNHCH}_2-$), 7.73 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, p -aryl), 7.93 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, m -aryl); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 22.1; 22.7; 24.8; 40.8; 42.5; 52.1; 62.0; 65.3; 121.7; 123.9; 124.8; 128.9; 129.2; 129.9; 129.9; 130.4; 137.6; 164.5; 166.3; 172.7; Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_5$: C, 50.61; H, 4.85; N, 5.62; zbadana: C, 50.66; H, 4.86; N, 5.40;

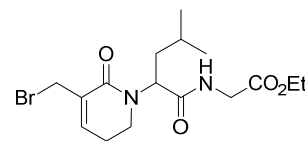
7.4.2.2.30. Związek 322a. Wygrzane w 110 °C naczynie Schlenka przepłukano argonem przez 1 godz. Rozpuszczono związek **321a** (100 mg, 0.25 mmola) w suchym chlorku



metylenu (25 ml). Dodano katalizator Hoveydy-Grubbsa 2-giej generacji (2 mg) i reakcję ogrzewano w temperaturze wrzenia w atmosferze argonu przez 4 godziny. Dodano kolejną porcję katalizatora (2 mg) i reakcję prowadzono przez kolejne 16 godzin w temperaturze pokojowej. Odparowano część chlorku metylenu do ok. 1 ml. Ze względu na obecność wielu produktów ubocznych pozostałość oczyszczono na preparatywnej płytce TLC, układem heksan octan etylu (1:1, obj:obj). Żel przepłukano układem chloroform – metanol (95:5, obj:obj) i odsączono przesączono przez celit. Otrzymano 42 mg produktu z wydajnością 45%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.93 (t, $J = 6.4$ Hz, 6H), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.44 – 1.49 (m 1H), 1.62 - 1.75 (m, 1H), 1.77 – 1.87 (m, 1H), 3.89 - 4.01 (m, 3H), 4.07 - 4.26 (m, 5H), 4.82 (dd, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 6.9$ Hz, 1H), 6.99 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.12 (s, 1 H) ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 14.4, 22.4, 22.7, 23.1, 25.0, 38.3, 41.5, 48.6, 53.4,

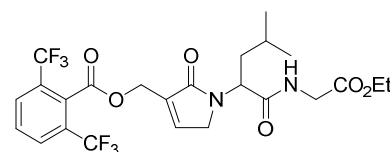
61.7, 135.9, 141.2, 169.8, 169.8, 171.0; HR-MS (ESI, $[M+Na^+]$) obliczono dla: $C_{15}H_{23}N_2O_4NaBr$: 397.0733, zbadana: 397.0730 m/z ;

7.4.2.2.31. Związek 322b. Wygrzane w 110 °C naczynie Schlenka przepłukano argonem przez 1 godz. Rozpuszczono związek **321b** (50 mg, 0.12 mmola) w suchym chlorku metylenu



(12 ml). Dodano katalizator Grubbsa 2-giej generacji (2 mg). Reakcję w atmosferze argonu, w temperaturze pokojowej przez 16 godzin. Po tym czasie zaobserwowano całkowitą konwersję substratu. Chlorek metylenu odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym układem heksan – octan etylu. Otrzymano 38 mg produktu z wydajnością 89%. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.94 (dd, $J_1 = 13.7, J_2 = 6.5$ Hz, 6 H) 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H) 1.47 - 1.60 (m, 1 H) 1.62 - 1.72 (m, 1 H) 1.73 - 1.84 (m, 1 H) 2.34 - 2.60 (m, 2 H) 3.33 - 3.50 (m, 2 H) 3.85 (dd, $J_1 = 18.1, J_2 = 5.0$ Hz, 1 H) 4.09 (dd, $J_1 = 18.1, J_2 = 6.4$ Hz, 1 H) 4.16 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.25 (dd, $J_1 = 9.2, J_2 = 6.3$ Hz, 1 H) 6.63 (t, $J = 5.5$ Hz, 1 H) 6.85 (t, $J = 4.1$ Hz, 1 H) 7.66 - 7.74 (m, 1 H) 7.88 - 7.96 (m, 2 H) ^{13}C NMR (50 Mhz, $CDCl_3$) δ 14.5, 22.2, 23.4, 24.5, 25.2, 29.4, 36.4, 40.9, 41.5, 54.0, 61.7, 132.8, 139.5, 164.2, 169.9, 171.4; HR-MS (ESI, $[M+Na^+]$) obliczono dla: $C_{16}H_{25}N_2O_4NaBr$: 411.0890, zbadana: 411.0901 m/z ;

7.4.2.2.32. Związek 323a. Związek **322a** (40 mg, 0.11 mmola) rozpuszczono w acetonie (2.7 ml) i dodano sól cesową kwasu 2,6-bis-(trifluorometylo)benzoesowego

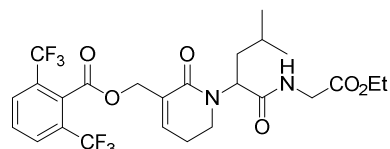


(125 mg, 0,32 mmola). Mieszano w temperaturze pokojowej przez 16 godzin. Aceton odparowano. Pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i wodorowęglanie sodu (nasycony roztwór wodny). Fazy rozdzielono. Fazę organiczną przemyto solanką i osuszono siarczanem magnezu. Octan etylu odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym układem heksan – octan etylu. Otrzymano 18 mg, produktu z wydajnością 31%. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0.94 – 0.96 (m, 6H), 1.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.43 - 1.53 (m, 1H), 1.71 - 1.79 (m, 1H), 1.80 - 1.87 (m, 1H), 3.89 - 4.02 (m, 3H), 4.17 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.10 - 4.24 (m, 1 H), 4.79 (dd, $J_1 = 9.5, J_2 = 6.4$ Hz, 1H), 5.11 - 5.20 (m, 2H), 6.57 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.69 - 7.75 (m, 1H), 7.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 Mhz, $CDCl_3$): δ 14.4, 22.3, 23.2, 25.0, 37.9, 41.6, 48.9, 53.4, 60.5, 61.8, 122.0, 124.2, 129.3, 129.6, 130.2, 130.2, 130.7, 133.3, 141.4, 164.9,

169.7, 170.4, 171.0; Analiza elementarna obliczona dla: C₂₄H₂₆F₆N₂O₆: C, 52.18; H, 4.74; N, 5.07; zbadana: C, 52.29; H, 4.87; N, 4.96;

7.4.2.2.33. Związek 323b. Związek **322b** (60 mg, 0.15

mmola) rozpuszczono w acetonie (3.9 ml) i dodano sól cesową kwasu 2,6-bis-(trifluorometylo)benzoesowego (181 mg, 0.46 mmola). Mieszano w temperaturze pokojowej

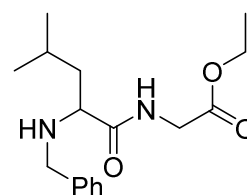


przez 16 godzin. Aceton odparowano. Pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i wodorowęglanie sodu (nasycony roztwór wodny). Fazę organiczną przemyto solanką i osuszono siarczanem magnezu. Octan etylu odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym układem heksan – octan etylu. Otrzymano 38 mg, produktu z wydajnością 44%. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.96 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.49 - 1.58 (m, 1H), 1.62 - 1.67 (m, 2H), 1.74 - 1.82 (m, 1H), 2.37 - 2.47 (m, 1H), 2.48 - 2.58 (m, 1H), 3.34 - 3.48 (m, 2H), 3.85 (dd, *J*₁ = 18.0, *J*₂ = 5.1 Hz, 2H), 4.09 (dd, *J*₁ = 18.1, *J*₂ = 6.4 Hz, 1H), 4.16 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 5.24 (dd, *J*₁ = 9.3, *J*₂ = 6.1 Hz, 1H), 6.58 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H) 6.84 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H) 7.64 - 7.75 (m, 1H) 7.86 - 7.94 (m, 2H); ¹³C NMR (125 Mhz, CDCl₃): δ 14.1, 21.9, 23.0, 24.1, 24.8, 35.9, 40.3, 41.1, 53.5, 61.3, 64.1, 121.7, 123.9, 128.8, 129.1, 129.2, 129.8, 129.8, 130.1, 140.4, 164.3, 164.6, 169.5, 171.1; Analiza elementarna obliczona dla: C₂₅H₂₈F₆N₂O₆+0.3H₂O: C, 52.45; H, 5.05; N, 4.89; zbadana: C, 52.30; H, 5.32; N, 4.89;

7.5. Modelowe badania nad reakcją Ugiego katalizowaną enzymatycznie

7.5.1. Procedura ogólna dla enzymatycznej reakcji Ugiego. Aldehyd (1 równ.) dodano do zawiesiny enzymu (20%_{mass}) w toluenie (0.02 mmola/ml) lub w toluenie z dodatkiem wody (5 μl/ml). Następnie dodano aminę (2 równ.) i reakcję mieszano na wytrząsarce przez 15 min. Po tym czasie dodano izocyjanek (1 równ.). Reakcję prowadzono przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Enzym odfiltrowano, toluen odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej.

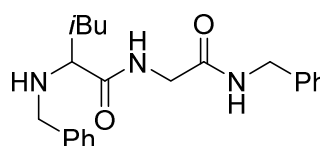
7.5.1.1. Związek 401. Procedura wykonana na podstawie reakcji opisanej poprzednio.⁴⁶ Do mieszaniny aldehydu (107 μL, 1 mmol) i benzyloaminy (109 μL, 1 mmol) w toluenie (1 ml) dodano



izocyjanooctanu etylu (110 μL , 1 mmol). Następnie dodano kwasu fenylofosfoniowego (18 mg). Reakcję ogrzewano w 80 $^{\circ}\text{C}$ przez 8 godzin. Toluen odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Otrzymano związek **227** jako bezbarwny olej z wydajnością 52%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.83 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.40 – 1.47 (m, 1H, CHMe_2), 1.57 – 1.71 (m, 3H, $\text{CH}_2(i\text{-Pr})$, NH), 3.22 (dd, $J_1 = 9.3$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1H, CH), 3.65 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, CHH), 3.85 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, CHH), 3.97 (dd, $J_1 = 5.3$ Hz, $J_2 = 20$ Hz, 1H, CHH), 4.11 (dd, $J_1 = 6.1$ Hz, $J_2 = 20$ Hz, 1H, CHH), 4.21 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 7.24 – 7.34 (m, 5H, ArH), 7.77 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 14.5, 22.0, 23.6, 25.4, 41.2, 43.2, 53.2, 61.1, 61.7, 127.6, 128.6, 128.9, 139.8, 170.3, 175.6;

7.5.1.2. Związek 400. Otrzymany według procedury ogólnej

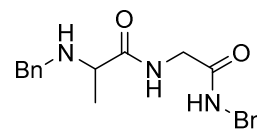
7.5.1; (Wydajność Tabela 11) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 0.80 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, -



$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.36 – 1.42 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.49 – 1.55 (m, 1H, $\text{CHHCH}(\text{CH}_3)_2$), 1.59 – 1.63 (m, 1H, $-\text{CHHCH}(\text{CH}_3)_2$), 2.03 (bs, 1H, BnNH-), 3.19 (dd, $J_1 = 4.7$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, 1H, $-\text{CH}(i\text{Bu-})$), 3.63 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, PhCHHNNH-), 3.77 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, PhCHHNNH-), 3.93 (dd, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{CO-}$), 4.42 – 4.46 (m, 2H, NHCH_2Ph), 6.77 (bs, 1H, NH), 7.23 – 7.33 (m, 10H, 2 x ArH), 7.94 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 22.1, 23.5, 25.4, 43.0, 43.6, 43.8, 53.2, 60.9, 127.8, 127.8, 128.0, 128.7, 128.9, 129.0, 138.3, 139.2, 169.3, 176.0; HR-MS (ESI, $[\text{M} + \text{H}^+]$) obliczona dla: $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_2$, 368.2333, zbadana: 368.2317. Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_2 + 3/2\text{H}_2\text{O}$: C, 69.63; H, 8.06; N, 11.43; zbadana: C, 69.33; H, 8.03; N, 10.77;

7.5.1.3. Związek 402. Otrzymany według procedury ogólnej 7.5.1;

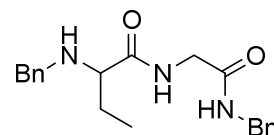
(Wydajność: Tabela 11). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.30 (d, $J =$



7.0 Hz, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.32 (bs, 1H, BnNH-), 3.30 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H, $-\text{NHCH}(\text{Me-})$), 3.73 (d, $J = 23.0$ Hz, 1H, PhCHHNNH-), 3.76 (d, $J = 23.0$ Hz, 1H, PhCHHNNH-), 3.93 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{CO-}$), 4.43 (dd, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 3.3$ Hz, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{Ph}$), 6.69 (bs, 1H, $-\text{CONH-}$), 7.23 – 7.34 (m, 10H, ArH), 7.95 (bs, 1H, $-\text{CONH-}$); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 19.7, 43.6, 43.8, 52.8, 57.8, 127.9, 128.0, 128.6, 128.9, 129.0, 138.2, 139.0, 169.2, 175.9; HR-MS (ESI, $[\text{M} + \text{H}^+]$) obliczona dla: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$, 326.1869, zbadana, 326.186 m/z ;

7.5.1.4. Związek 403. Otrzymany według procedury ogólnej 7.5.1

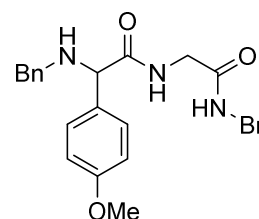
(Wydajność Tabela 11), ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 0.88 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.55 – 1.64 (m, 1H, $-\text{CHHCH}_3$), 1.68 – 1.76



(m, 1H, $-\text{CHHCH}_3$), 2.09 (bs, 1H, BnNH-), 3.11 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, $-\text{NHCH}(\text{Et})-$), 3.67 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H, PhCHHNNH-), 3.76 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H, PhCHHNNH-), 3.94 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CO-}$), 4.42 (dd, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{Ph}$), 6.86 (bs, 1H, $-\text{CONH-}$), 7.22 – 7.33 (m, 10H, ArH), 7.92 (bs, 1H, $-\text{CONH-}$); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 10.4, 26.7, 43.5, 43.8, 53.1, 63.7, 127.8, 127.8, 128.0, 128.6, 128.9, 129.0, 138.3, 139.3, 169.2, 175.3; HR-MS (ESI, $[\text{M} + \text{H}^+]$) obliczona: $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2$, 340.2025, zbadana, 340.2026 m/z ;

7.5.1.5. Związek 404. Otrzymany według procedury ogólnej 7.5.1

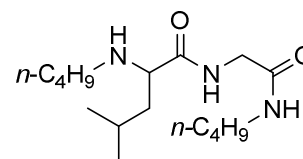
(Wydajność Tabela 11); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.94 (bs, 1H $-\text{NH-}$), 3.74 – 3.78 (m, 2H, $\text{PhCH}_2\text{NH-}$), 3.94 (m, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{Ph}$), 4.18 (s, 1H, $\text{NH}(4\text{-MeO-Ph})\text{CH-}$), 4.31 – 4.42 (m, 2H, $-\text{CONHCH}_2\text{CO-}$), 6.51 (bs, 1H, $-\text{NH-}$), 6.79 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H,



ArH), 7.18 – 7.35 (m, 12H, ArH), 7.82 – 7.85 (m, 1H $-\text{NH-}$); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 43.6, 43.8, 52.4, 55.6, 66.0, 114.7, 127.8, 127.9, 128.0, 128.8, 128.9, 129.0, 138.2, 160.0, 169.0, 173.4. HR-MS (ESI, $[\text{M} + \text{H}^+]$) obliczona dla: $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$, 418.2131, zbadana dla: 418.2130 m/z ;

7.5.1.6. Związek 405. Otrzymany według procedury ogólnej

7.5.1, Wydajność Tabela 11. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.77 – 0.91 (m, 12H, 4x CH_3), 1.09 – 1.14 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.19 – 1.46 (m, 10H, 2x- $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$; $-\text{CH}_2(i\text{Pr})$), 1.74 – 1.89



(m, 1H, AlkNH-), 2.47 – 2.52 (m, 2H, $(n\text{-C}_3\text{H}_7)\text{CH}_2\text{NH-}$), 2.92 – 2.99 (m, 1H, $-\text{NHCH}(i\text{Bu})\text{CO-}$), 3.17 – 3.22 (m, 2H, $-\text{NHCH}_2(n\text{-C}_3\text{H}_7)$), 3.92 – 3.89 (m, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{CO-}$), 6.80 (bs, 1H, $-\text{CONH-}$), 7.98 – 8.09 (m, 1H, $-\text{CONH-}$); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 12.1, 12.3, 14.0, 14.2, 14.6, 16.2, 20.3, 20.6, 25.3, 27.1, 31.8, 32.6, 32, 38.1, 38.6, 39.4, 43.5, 49.7, 49.8, 66.7, 68.0, 169.3, 169.3, 175.3, 175.8; HR-MS (ESI, $[\text{M} + \text{H}^+]$) obliczona dla: $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_2$, 300.2651, zbadana 300.2651 m/z ;

7.5.1.7.Związek 406. Otrzymany według procedury ogólnej 7.5.1

(Wydajność Tabela 11). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 0.83 – 0.91

(m, 8H), 0.93 – 0.97 (m, 3H), 1.13 – 1.19 (m, 1H), 1.26 – 1.37 (m,

12H), 1.41 – 1.49 (m, 5H), 1.81 – 1.95 (m, 1H), 2.52 – 2.58 (m, 2H), 3.02 – 3.07 (m, 1H),

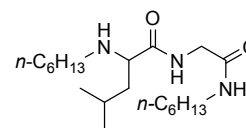
3.23 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.87 – 3.99 (m, 2H), 6.58 (bs, 1H), 8.0 – 8.10 (m, 1H) ^{13}C NMR

(125 MHz, CDCl_3): δ 12.2, 12.3, 14.3, 14.3, 14.7, 16.2, 22.9, 22.9, 25.5, 26.9, 27.1, 27.2,

29.8, 30.0, 30.5, 31.8, 32.0, 38.1, 38.6, 39.9, 43.8, 43.8, 50.0, 50.2, 66.7, 67.9, 169.4,

169.4; HR-MS (ESI, $[\text{M} + \text{H}^+]$) obliczona dla: $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_2$, 356.3277, zbadana, 356.3282

m/z ;



7.5.1.8.Związek 407. Otrzymany według procedury ogólnej 7.5.1

(Wydajność Tabela 11). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 0.93 (d, $J =$

6.5 Hz, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.95 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.41 – 1.47 (m, 1H,

$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.57 – 1.63 (m, 1H, $-\text{CHH}(i\text{Pr})$), 1.67 – 1.74 (m, 1H, $-\text{CHH}(i\text{Pr})$), 2.53 (bs,

1H, $-\text{NH}-$, amine), 3.18 – 3.28 (m, 3H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{NH}$; $-\text{CH}(i\text{Bu})$), 3.88 (tt, $J_1 = 5.7$ Hz,

$J_2 = 1.5$ Hz, 2H, $-\text{CONHCH}_2-$), 3.96 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, CONHCH_2-), 5.11 – 5.13 (m, 1H,

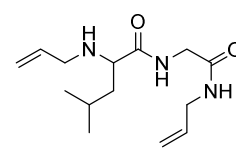
$-\text{C}=\text{CHH}$), 5.13 – 5.15 (m, 1H, $-\text{C}=\text{CHH}$), 5.18 (dq, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, $-\text{C}=\text{CHH}$),

5.21 (dq, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, $-\text{C}=\text{CHH}$), 5.78 – 5.91 (m, 2H, $2x-\text{CH}=\text{CH}_2$),

6.62 (bs, 1H, $-\text{CONH}-$), 7.97 (bs, 1H, $-\text{CONH}-$); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):

δ 22.3, 23.4, 25.4, 42.2, 42.9, 43.6, 51.4, 60.6, 116.8, 117.6, 134.1, 135.6, 169.3, 175.9;

HR-MS (ESI, $[\text{M} + \text{Na}^+]$) obliczona: $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$, 290.1844, zbadana, 290.184 m/z ;



8. Cytowana literatura

1. International Agency for Research on Cancer, GlobCan Program, World Health Organization; www.globcan.iarc.fr
2. Gante, J., *Angew. Chem., Int. Ed.* **1994**, *33*, 1699
3. Tsetlin, V., *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 281
4. Park, C.; Choi, H.; Son, Y.-C.; Lee, C.S.; Choy, N.; Koh, J.S.; Lee, T.G.; Kwon, Y.D.; Kim, S.C.; Yoon, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 585
5. Swieten van, P.F.; Samuel, E.; Hernández, R.O.; van den Nieuwendijk, A.M.C.H.; Leeuwenburgh, M. A.; Marel van der, G.A.; Kessler, B.M.; Overkleefta, H.S.; Kisselev, A.F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 3402
6. Prasad, C.V.C.; Vig, S.; Smith, D.W.; Gao, Q.; Polson, C.T.; Corsa, J.A.; Guss, V.L.; Loo, A.; Barten, D.M., Zheng, M.; Felsenstein, K.M.; Roberts, S.B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 3535
7. Domling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168
8. Dömling, A., *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 17
9. Ugi, I., Meyr R., Fetzer, A., Steinbrueckne, C., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1959**, *71*, 386
10. Pirrung, M. C.; Sarma, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 444
11. Liu, N., Cao, S., Wu, J., Yu, J., Shen, L., Feng, X., Qian, X., *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 3966
12. Koch H.P., Czejka M.J., *J. Biosci.* **1986**, *41*, 11
13. Zhao, W., Huang, L., Guan, Y., Wulff, W. D., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3436
14. Yue, T., Wang, M-X., Wang, D-X., Masson, G., Zhu, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6717
15. Ramon, D. J., Yus, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1602
16. Marquarding, D.; Hoffmann, P.; Heitzer, H.; Ugi, I., *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1969
17. Kunz, H.; Pfengle, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 651
18. Kunz, H.; Pfengle, W. *Synthesis* **1991**, 1039
19. Lehnoff, S., Goebel, M., Karl, R.M., Klosel, R., Ugi I., *Ang. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1104
20. Faggi, C.; Marcaccini, S.; Pepino, R.; Pozo, M. C. *Synthesis* **2002**, 2756
21. C. L. Kelly, K. W. M. Lawrie, P. Morgan, C. L. Willis, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 8001
22. a) Tempest, P., Pettus, L.; Gore, V., Hulme, C. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 1947–1950 b) Bauer, S. M., Armstrong, W., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6355
23. Hulme, C., Morrissette, M. M., Volz, F. A., Burns, C. J., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1113
24. Ziegler, T., Kaisers, H. J., Schlomer, R., Koch, C., *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 8391
25. Kelly, C.L., Lawrie, K. W. M. Morgan, P., Willis, C. L., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8001
26. a) T. Yamada, N. Motoyama, T. Taniguchi, Y. Kazuta, T. Miyazawa, S. Kuwata, K. Matsumoto, M. Sugiura, *Chem. Lett.* **1987**, 723; b) C. Hebach, U. Kazmaier, *Chem. Commun.* **2003**, 596
27. Demharter, A., Horl, W., Herdtweck, E., Ugi, I., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *35*, 173
28. Basso, A., Banfi, L., Riva, R., Guant, G., *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 2, 575
29. Koopmanschap, G., Ruijter, Orru, R. V. A., *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 544
30. Bowers, M. M.; Carroll, P.; Joullié, M. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1989**, 857
31. Ngouansavanh, T., Zhu, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5775
32. Chapman, T. M., Davies, I. G., Gu, B., Block, T. M., Scopes, D. I. C., Hay, P. A., Courtney, S. M., McNeill, L. A., Schofield, C. J., Davis, B. G., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 506
33. Thompson, M.J., Chen, B., *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7084
34. Kazmaier, U.; Hebach, C. *Synlett* **2003**, 1591

35. Pick, R.; Bauer, M.; Kazmaier, U.; Hebach, C. *Synlett* **2005**, 757
36. Mroczkiewicz, M.; Winkler, K.; Nowis, D.; Placha, G.; Golab, J.; Ostaszewski, R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1509
37. Costa, S. P. G.; Maia, H. L. S.; Pereira-Lima, S. M. M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1475
38. Sheehan, S. M.; Masters, J. J.; Wiley, M. R.; Young, S. C.; Liebeschuetz, J. W.; Jones, S. D.; Murray, C. W.; Franciskovich, J. B.; Engel, D. B.; Weber, W. W.; Marimuthu, J.; Kyle, J. A.; Smallwood, J. K.; Farmen, M. W.; Simth, G. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2255
39. Thompson, M. J.; Chen, B. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5324
40. Sung, K., Chen, F-L, Huang, P-C., *Synlett*, **2006**, 2667
41. Bayer, T.; Riemer, C.; Kessler, H. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 250
42. Domling, A., Wang, W., Wang, K., *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3083
43. Maison, W., Schlemminger, I., Westerhoff, O., Martens, J., *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1343
44. Keating, T.A., Armstrong, R.W., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *118*, 2574
45. Hulme, C., Ma, L., Cherrier, M-P., Romano, J.J., Morton, G., Duquenne, C., Salvino, J., Labaudiniere, R., *Tetrahedron Asymm.* **2000**, *41*, 1883
46. Pan, S. C., List, B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3622
47. Kumar, A., Saxena, D., Kumar-Gupta, M., *RSC Adv.* **2013**, *3*, 410
48. Shaabani, A., Keshipour, S., Shaabani, S., Mahyari, M., *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1641
49. Mofakham, H., Hezarkhani, Z., Shaabani, A., *J. Mol. Catal. A.* **2012**, *360*, 26
50. Faber, K., "Biotransformations in Organic Chemistry", Springer-Verlag, Berlin, **2004**
51. Bornscheuer, U., T., Kazlauskas, R. J., "Hydrolases in Organic Synthesis: Stereoselective Biotransformations" Wiley VCH, Weinheim, **2006**.
52. H. Drauz, M. Waldman, "Enzyme Catalysis In Organic Synthesis" Wiley-VCH, Weinheim, **2002**
53. Yanto, Y., Winkler, C. K., Lohr, S., Hall, M., Faber, K., Dommarius, A.S., *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2540
54. Kim, H. J., Ruszczycky, M. W., Choi, S-H., Liu, Y-N., Liu, H-W., *Nature*, **2011**, *473*, 109
55. a) Reetz, M.T., Schimossek K., *Chimia*, 1996, *50*, 668–669; b) Paetzold, J., Bäckvall, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620
56. Monografia na temat chiralnych amin: Nugent, T.C., "Chiral amine synthesis", Wiley VCH, Weinheim, **2010**
57. Smidt, H., Fischer, A., Fischer, P., Schmid, R.D., Stelzer, U., **1996**, Patent DE:19507217
58. Messina, F., Botta, M., Corelli, F., Schneider, M.P., and Fazio, F. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 3767
59. Andrade, L.H. and Silva, A.V. *Tetrahedron: Asymm.* **2008**, *19*, 1175
60. Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Sturmer, R., Zelinski, T. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, *43*, 788
61. Ismail, H., Lau, R. M., Rantwijk van, F., Sheldon, R.A., *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1511
62. Koszelewski, D., Tauber, K., Faber, K., Kroutil, W., *Trends in Biotech.* **2010**, *28*, 324
63. Matcham, G.W., Bowen, A.R.S. *Chim. Oggi*, **1996**, *14*, 20
64. Cho, B.K., Cho, H.J., Park, S.H., Yun, H., Kim, B.G., *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81*, 783
65. Yun, H., Cho, B. K., Kim, B.G., *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *87*, 772
66. Yun, H., Yang, Y. H., Cho, B. K., Hwang, B., Y., Kim, B.G, *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 809
67. Simon, R.C., Richter, N., Busto, E., Kroutil, W., *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129
68. Ostaszewski, R.; Portlock, D. E.; Fryszkowska, A.; Jeziorska, K. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 413
69. Znabet, A., Ruijter, E., Kanter de, F.J.J., Kohler, V., Helliwell, M., Turner, N. J., Orru,

- R.V.A, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5289
70. Kohler, V., Bailey, K.R., Znabet, A., Raftery, J., Manaleine, H., Turner, N.J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *122*, 228
 71. Khersonsky, O., Roodveldt, C., Tawfik, D. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 498
 72. Bornscheuer, U., T., Kazlauskas, R. J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032
 73. Bringer-Meyer, S., Sahm, H., *Biocatalysis* **1988**, *1*, 321
 74. a) Copley, S.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 265; b) Hult, K., Berglund, P., *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231
 75. Taglieber, A. Hobenreich, H., Carballeira, J. D., Mondire, R. J. G., Reetz, M. T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8597
 76. O'Brien, P. J., Herschlag, D., *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R91
 77. Branneby, C., Carlqvist, P., Magnusson, A., Hult, K., Brinck, T., Berglund, P., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874
 78. Svedendahl, M., Hult, K., Berglund, P., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17988
 79. Wang, J.-L., Liu, B.-K., Yin, C., Lin, X.-F., *Tetrahedron* **2011**, *67*, 2689
 80. Li, K., He, T., Li, C., Feng, X. W., Wang, N., Yu, X. Q., *Green Chem.* **2009**, *11*, 777
 81. Nordberg, J., Arner, E. S., *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 1287
 82. Zhang, D. X., Gutterman, D. D., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292*, p. H2023
 83. Nguyen, P., Awwad, R.T. Smart, D.D. K., Spitz D.R., Gius D., *Cancer Lett.* **2006**, *236*, 164
 84. Rhee, S. G., Chae, H. Z., Kim, K., *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 1543
 85. Burcham, P. C., *Mutagenesis*, **1998**, *13*, 287
 86. Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 143
 87. Fujino, G. Noguchi, T., Kohsuke T., Ichijo H., *Sem. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 427
 88. Tonissen K. F., Trapani D.G., *Mol. Nutr. Food. Res.*, **2009**, *53*, 87
 89. Gromer S., Urig S., Becker K. *Med. Res. Rev.*, **2004** *24*, 1, 40
 90. Rhee, S. G., Chae, H. Z., Kim, K., *Free Radic. Biol. Med.*, **2005**, *38*, 1543
 91. Ueno, M.; Masutani, H.; Arai, R. J.; Yamauchi, A.; Hirota, K.; Sakai, T.; Inamoto, T.; Yamaoka, Y.; Yodoi, J.; Nikaido, T., *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 35809
 92. Powis, G.; Montfort, W. Annu. R., *Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2001**, *41*, 261
 93. Holmgren, A., *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 13963
 94. Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., *Science* **1997**, *275*, 90
 95. Berggren, M., Gallegos, A., Gasdaska, J.R., Gasdaska, P.Y., Warneke, J., Powis, G., *Anticancer Res.*, **1996**, *16*, 3459
 96. Kim, S. J., Miyoshi, Y.; Taguchi, T.; Tamaki, Y., Nakamura, H.; Yodoi, J.; Kato, K.; Noguchi, S. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*, 8425
 97. Sasada, T., Nakamura, H., Ueda, S., Sato, N., Kitaoka, Y., Gon, Y., Takabayashi, A., Spyrou, G., Holmgren, A., Yodoi J., *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, *27*, 504
 98. Gromer, S., Arscott, L.D., Williams, Jr, C.H., Schrimmer, R.H., Becker, K., *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20096
 99. Marzano, C., Gandin, V., Folda, A., Scutari, G., *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 872
 100. Mura, P., Camalli, M., Bindoli, A., Aorrentino, F., Casini, A., Gabbiani, C., Corsini, M., Zanello, P., Rigobello M.P., Messori, P., *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5871
 101. Cai, W., Zhang, L., Song, Y., Wang, B., Zhang, B., Cui, X., Hu, G., Liu, Y., Wu, J., Fang, J., *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 257
 102. Sun, Q., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K.T., Lee, B. J., Hetfield, L.D., Gladyshev, N.V., *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24522
 103. PCT Int. Appl. WO 2000006088 A2 20000210, 2000
 104. Gomi, T., Fujioka, M., *Biochemistry* **1982**, *21*, 4171

105. Calabrese, V., Bates, B.E., Mancuso, C., Cornelius, C., Ventimiglia, B., Cambria, M.T., Di Renzo, L., De Lorenzo, A., Dinkova-Kostova D., *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, *52*, 1062
106. Fang, J., Lu, J., Holmgren, A., *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 25284
107. Bradshaw, T. D., Matthews, C. S., Cookson, J., Chew, E. H., Shah, M., Bailey, K., Monks, A., Harris, E., Westwell, A. D., Wells, G., Laughton, C. A., Stevens, M. F., *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 3911
108. Powis, G., Wipf, P., Lynch, S. M., Birmingham, A., Kirkpatrick, D. L. *Mol. Cancer Ther.*, **2006**, *5*, 630
109. Pallis, M.; Bradshaw, T. D.; Westwell, A. D.; Grundy, M. Stevens, M. F.; Russell, N. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *66*, 1695
110. Wipf, P., Lynch, S. M., Birmingham, A., Tamayo, G., Jimenez, A., Campos, N., Powis, G., *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1651
111. Kirkpatrick, D. L., Kuperus, M., Dowdeswell, M., Potier, N. Donald, L. J., Kunkel, M., Berggren, M., Angulo, M., Powis, G. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 987
112. Shah, J.J., Orlowski, R. Z., *Leukemia* **2009**, *23*, 1964
113. Engemyr, L.B.; Martinsen, A.; Songstad J. *Acta Chem. Scand. Ser. A*, **1974**, *28*, 255
114. a) Hofmann, A.W. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1867**, *144*, 114; b) Gokel, G.W.; Widera, R.P., Weber, W.P. *Org. Synth.*, **1976**, *55*, 96
115. Kitano, Y.; Chiba, K.; Tada, M. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 1911
116. Hofmann, A.W. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1870**, *3*, 766
117. Ugi, I.; Meyr, R. *Chem. Ber.*, **1960**, *93*, 239
118. a) Barton, D.H.R.; Bowles, T.; Husinec, S.; Forbes, J.E.; Llobera, A; Porter, A.E.A.; Zard, S.Z. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 3343 (fosgen); b) Skorna, G.; Ugi, I. *Angew. Chem.*, **1977**, *89*, 267 (difosgen); c) Eckert, H.; Forster, B.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1987**, *26*, 894, (trifosgen)
119. Leusen van, A.M.; Boerma, G.J.M.; Helmholdt, R.B.; Siderius, H.; Strating, J. *Tetraheron Lett.*, **1972**, *13*, 2367
120. Klossowski, S., Muchowicz, A., Redzej, A., Swiech, M., Firczuk, M., Gołąb, J., Ostaszewski, R., *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 55
121. Greef de, M.; Abeln, S.; Belkasmı, K.; Dömling, A.; Orru, V. A. R.; Wessjohann, A. L. *Synthesis* **2006**, *23*, 3997
122. Krantz, A.; Copp, L. J.; Coles, P. J.; Smith, R. A.; Heard, S. B. *Biochemistry* **1991**, *30*, 4678-4687
123. Frelek, J., Fryszkowska, A., Kwit, M., Ostaszewski, R., *Tetrahedron: Asymm.*, **2006**, *17*, 2469-2478
124. Ding, K., Chen, J., Ji, M., Wu, X., Varady, J., yang, C-Y, Lu, Y., Deschamps, J. R., Levant, B., Wang, S., *J. Med Chem.*, **2005**, *48*, 3171
125. Dem'yanovich, V. M.; Shishkina, I. N., *Russ. J. Org. Chem.*, **1996**, *32*, 1336
126. Kinbara, K., Sakai, K., Hashimoto, Y., Nohira, H., Saigo, K., *Tetrahedron Assym.* **1996**, *7*, 1539
127. *Dla niektórych enzymów zastosowano inne pH, rekomendowane przez producenta, jeśli było podane*
128. a) Brodzka, A., Koszelewski, D. Ostaszewski, R., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **2012**, *82*, 96 b) Brodzka, A., Koszelewski, D., Cwiklak M., Ostaszewski, R., *Tetrahedron: Asymm.*, **2013**, *24*, 427
129. *Badania zostały wykonane przez Przemysława Kalickiego z grupy Prof. Zofii Lipkowskiej, w Instytucie Chemii Organicznej PAN.*
130. Flack, H. D., Bernardinelli, G., *Acta Cryst.*, **1999**, *A55*, 908

B. Org. 366/15

131. Greene, T. W., Wuts, P. G. M., "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley-Interscience, New York, **1999**
132. a) Mitra, S.; Lawton, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3097 b) Liberatore, F. A., Comeau, R. D., McKearin, J. M., Pearson, D. A., Belonfa III, B. Q., Brocchini, S. J., Kath, J., Phillips, T., Oswell, K., Lawton, R. G., *Bioconjugate Chem.*, **1990**, *1*, 36
133. *Listę wszystkich enzymów stosowanych w badaniach przesiewowych umieszczono w części eksperymentalnej.*
134. Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. Purification of laboratory Chemicals, 4th ed, Elsevier: Oxford, 2000.
135. Ralbovsky J., L., Sicola, P. M., Sugino, E., Burgos-Garcia, C., Weinreb, S. M., Parves, M., *Heterocycles*, **1996**, *43*, 7, p. 1497 – 1512
136. Burns, D. H., Jabara S. C., Burden W. M., *Syn. Comm.* **1995** *25*, p. 379 - 387
137. McKenna, M. J., Halley, F., Souness J. E., McLay, I. M., Picket S.D., Collis, A. J., Page, K., Ahmed, I., *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, p. 2173 - 2184



Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.366/15



90000000191015