

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
2. STRESZCZENIE	12
3. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	14
3.1. LEKI PRZECIWRZYBICZE STOSOWANE W PRAKTYCE KLINICZNEJ	15
3.2. SYNTAZA GLUKOZAMINO-6-FOSFORANU – CEL MOLEKULARNY NOWEJ KLASY POTENCJALNYCH LEKÓW PRZECIWRZYBICZYCH	16
3.3. NANONOŚNIKI – „NARZĘDZIA” UŁATWIAJĄCE TRANSPORT PRZEZ BŁONĘ LIPIDOWĄ	19
3.3.1. STRATEGIA „KONIA TROJAŃSKIEGO” W TRANSPORCIE SUBSTANCJI AKTYWNYCH	20
3.3.2. NANORURKI	21
3.3.2.1. FUNKCJONALIZOWANIE NANORUREK	22
3.3.3. DENDRYMERY	26
3.3.3.1. METODY OTRZYMYWANIA DENDRYMERÓW	26
3.3.3.2. STRATEGIE SPRZĘGANIA DENDRYMERÓW Z CZĄSTECZKAMI BIOLOGICZNIE AKTYWNYMI	29
3.3.4. SIDEROFORY	32
3.3.4.1. SYNTEZA WYBRANYCH SIDEROFORÓW NATURALNYCH	32
3.3.4.2. POŁĄCZENIA SIDEROFORÓW Z CZĄSTECZKAMI AKTYWNYMI BIOLOGICZNIE	34
3.3.5. PEPTYDY PENETRUJĄCE	37
3.3.6. PARASOLE MOLEKULARNE	39
3.3.6.1. IDEA TRANSPORTU Z WYKORZYSTANIEM PARASOLI MOLEKULARNYCH	39
3.3.6.2. SYNTEZA POŁĄCZEŃ PARASOLI MOLEKULARNYCH Z CZĄSTECZKAMI TRANSPORTOWANYMI	41
4. CEL I ZAKRES PRACY	49
5. WYNIKI I DYSKUSJA	50
5.1. SYNTEZA BEZPOŚREDNICH POŁĄCZEŃ PARASOLI MOLEKULARNYCH Z CZĄSTECZKAMI TRANSPORTOWANYMI	54
5.1.1. SYNTEZA PARASOLI MOLEKULARNYCH	54
5.1.2. SYNTEZA POŁĄCZEŃ PARASOLI MOLEKULARNYCH Z DANSYLOGLICYNĄ I FMDP	54
5.2. SYNTEZA PARASOLI MOLEKULARNYCH Z ŁĄCZNIKIEM ω -AMINOACYLOWYM	56
5.2.1. SYNTEZA KONIUĞATÓW PARASOLI MOLEKULARNYCH Z FMDP Z UŻYCIEM ŁĄCZNIKÓW ω -AMINOACYLOWYCH	57
5.2.2. SYNTEZA KONIUĞATÓW PARASOLI MOLEKULARNYCH Z MAKROLIDAMI POLIENOWYMI Z UŻYCIEM ŁĄCZNIKÓW ω -AMINOACYLOWYCH	59
5.3. SYNTEZA PARASOLI MOLEKULARNYCH Z ŁĄCZNIKIEM O-DITIOBENZOILOKARBAMOILOWYM	59
5.4. SYNTEZA PARASOLI MOLEKULARNYCH Z ŁĄCZNIKIEM TYPU ‘TRIMETHYL LOCK’	63
5.5. BADANIA BIOLOGICZNE	74
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE	77
7. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	80
7.1. APARATURA	80
7.2. OPIS SYNTEZ	81
7.2.1. SYNTEZA PARASOLI MOLEKULARNYCH	81

7.2.2. SYNTEZA BEZPOŚREDNICH POŁĄCZEŃ PARASOLI MOLEKULARNYCH Z DANSYLOGLICYNĄ I FMDP	82
7.2.3. SYNTEZA PARASOLI MOLEKULARNYCH Z ŁĄCZNIKIEM ω -AMINOACYLOWYM	85
7.2.4. SYNTEZA PARASOLI MOLEKULARNYCH Z FMDP Z WYKORZYSTANIEM ŁĄCZNIKÓW ω -AMINOACYLOWYCH	89
7.2.5. SYNTEZA PARASOLI MOLEKULARNYCH Z ŁĄCZNIKIEM <i>O</i> -DITIOBENZOILOKARBAMOILOWYM	95
7.2.6. SYNTEZA UKŁADU 'TRIMETHYL LOCK'	99
7.2.7. SYNTEZA KONIUGATÓW PARASOLI MOLEKULARNYCH Z FMDP, <i>CIS</i> -PENTACYNĄ I Lys(MCA) Z WYKORZYSTANIEM ŁĄCZNIKA 'TRIMETHYL LOCK'	111
8. SUMMARY	118
9. LITERATURA.....	119
10. DOROBEK NAUKOWY	131

ROZDZIAŁ 1

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

^{13}C NMR	magnetyczny rezonans jądrowy węgla ^{13}C
^1H NMR	magnetyczny rezonans jądrowy protonów
AcOEt	octan etylu
AcOH	kwas octowy
AcOt-Bu	octan <i>tert</i> -butylu
AmB	amfoterycyna B
ATP	adenozynotrifosforan
BADP	kwas (<i>S</i>)- <i>N</i> ³ -(4-fenylfumaroilo)-2,3-diaminopropanowy
BDAP	kwas (<i>S</i>)- <i>N</i> ³ -(2-bromo-1-oksoetylo)-2,3-diaminopropanowy
BDTNB	3,3'-bis(4-oksobenzo[d][1,2,3]-triaz-3(4 <i>H</i>)-oksykarbonylo)-4,4'-dinitro-1,2-difenylosulfan
Boc	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
Boc₂O	pirowęglan di- <i>tert</i> -butylu
Boc-ON	2-(<i>tert</i> -butoksykarbonylooksyimino)-2-fenylacetonitryl
brs	szeroki singlet
Cbz	grupa benzoksykarbonylowa
CCA	kwas α -nitrylo-4-hydroksycynamonowy
CNT	nanorurka
d	dublet
DansGly	dansyloglicyna
DCC	<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DCM	dichlorometan
DCU	<i>N,N'</i> -dicykloheksylomocznik
DHB	kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropyluetyloamina
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetyloamino)pirydyna
DMD	3,3-dimetylodioksiran
DMSO-<i>d</i>₆	deuterowany dimetylosulfotlenek
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
DSC	węglan di- <i>N</i> -hydroksysukcynimidu



DTT	ditiotreitrol
EADP	kwasy (<i>S</i>)- <i>N</i> ³ -(4-amino-2-epoksy-1,4-dioksobutylo)-2,3-diaminopropanowy
EH₅₀	stężenie związku powodujące lizę 50% erytrocytów
Et	grupa etylowa
FMDP	kwasy (<i>S</i>)- <i>N</i> ³ -(4-metoksyfumaroylo)-2,3-diaminopropanowy
Fmoc	grupa fluorenylometoksykarbonylowa
Fmoc-NHS	węglan fluorenylometoksy- <i>N</i> -hydroksysukcynimidowy
Fru-6-P	fruktozo-6-fosforan
FTIR	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
GlcN-6-P	glukozamino-6-fosforan
GS⁻	glutation, forma zdeprotonowana
GSH	glutation
HeLa	komórki nowotworu szyjki macicy
Hex	heksan
HIV	ludzki wirus niedoboru odporności
HOBt	1-hydroksybenzotriazol
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HRMS-ESI	wysokorozdzielcza spektrometria mas z elektrorozpyleniem
K-FGF	fragment domeny sygnałowej czynnika wzrostu fibroblastów Kaposiego
LC/MS	chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
m	multiplet
<i>m/z</i>	stosunek masy do ładunku
Mca	4-karboksymetylo-7-metoksykumaryna
Me	grupa metylowa
MeOH	metanol
MIC₅₀	minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów w 50%
MIC₈₀	minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów w 80%
MIC₉₀	minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów w 90%
MS-MALDI	spektrometria mas z jonizacją MALDI
MU	parasol molekularny
MWCNT	wielościenna nanorurka
NHS	<i>N</i> -hydroksysukcynimid
Nys	nystatyna A ₁
PAF-26	syntetyczny sześćoaminokwasowy peptyd penetrujący
PAMAM	dendrymery oparte o struktury poliamidoamin
pAntp	naturalny sześćdziesięcioaminokwasowy peptyd penetrujący
PCC	chlorochromian pirydyniowy
PEG	glikol polietylenowy
Ph	grupa fenylowa
PL	fosfolipid
PLC	preparatywna chromatografia cienkowarstwowa
PPI	dendrymery oparte o struktury polipropylenoamin
<i>p</i>-TsOH	kwasy <i>p</i> -toluenosulfonowy



Py	pirydyna
RPMI	rodzaj pożywki
q	kwartet
q_i	kwintet
Q-TOF	analizator czasu przelotu
R	grupa alkilowa lub arylowa
R_f	współczynnik retencji
RNA	kwas rybonukleinowy
s	singlet
siRNA	małe interferujące RNA
SWCNT	jednościenna nanorurka
t	tryplet
t-Bu	grupa <i>tert</i> -butylowa
Tat	naturalny osiemdziesięciosześciamiнокwasowy peptyd penetrujący
TBDMSCI	<i>tert</i> -butylodimetylochlorosilan
TCEP	chlorowodorek tris(2-karboksyetylo)fosfiny
TDBTU	tetrafluoroboran <i>O</i> -(3,4-dihydro-4-okso-1,2,3-benzo-3-triazyno)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylomocznika
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografia cienkowarstwowa
tt	temperatura topnienia
tw	temperatura wrzenia
YNB-SA	rodzaj pożywki



ROZDZIAŁ 2

2. Streszczenie

Jednym z najpoważniejszych problemów z jakimi napotyka się współczesna medycyna są grzybowe infekcje układowe. Pomimo gwałtownego rozwoju współczesnej medycyny, umożliwiającej szybkie diagnozowanie i leczenie schorzeń wywoływanych przez patogenne mikroorganizmy, ciągle obserwuje się tendencję wzrostową zachorowań na grzybice wewnętrzne, często prowadzące do śmierci pacjentów. Istnieje więc ciągła potrzeba poszukiwania nowych leków lub udoskonalania już istniejących, wykazujących skuteczność w walce z grzybowymi patogenami przy jednoczesnej niskiej toksyczności w stosunku do komórek ludzkich.

W ramach badań, opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, zaprojektowano, otrzymano oraz scharakteryzowano połączenia tzw. parasoli molekularnych ze związkami o udowodnionej aktywności przeciwgrzybowej – FMDP i *cis*-pentacyny – będących inhibitorami enzymów grzybowych. Wspomniane cząsteczki aktywne wykazują dobre właściwości przeciwgrzybowe, jednak ze względu na swoją budowę chemiczną i polarny charakter, wykazują silnie ograniczoną zdolność do przenikania przez biwarstwę lipidową. Parasole molekularne stanowią grupę stosunkowo niedawno poznanych nanonośników, zdolnych do przenikania błon biologicznych na drodze dyfuzji prostej oraz zdolnych do transportu cząsteczek polarnych do wnętrza komórek. W efekcie badań eksperymentalnych otrzymano czternaście pochodnych – dziesięć połączeń parasoli molekularnych z cząsteczkami aktywnymi oraz cztery pochodne fluorescencyjne. W ramach pracy badawczej przetestowano możliwość tworzenia koniugatów parasoli molekularnych z cząsteczkami transportowanymi połączonych za pośrednictwem różnych łączników. Zaproponowano także dwie alternatywne metody syntezy struktur parasolowych. Najprostsze otrzymane pochodne to bezpośrednie połączenia amidowe struktury nanonośnika z cząsteczką transportowaną. Pozostałe koniugaty zawierają w swojej strukturze labilny łącznik potencjalnie ulegający lizie w środowisku cytoplazmy patogennych komórek grzybowych. Jednymi z zastosowanych łączników są struktury dipeptydowe, w których cząsteczka ładunku połączona jest za pośrednictwem wiązania peptydowego, potencjalnie rozpoznawanego przez komórkowe amidazy. W innym podejściu zastosowano



ideę tzw. układu 'trimethyl lock'^a labilnego w środowisku aktywności esteraz, w którym to cząsteczka ładunku tworzy wiązanie amidowe z jedną z grup karboksylowych wspomnianego układu. Podjęto także próbę syntezy koniugatów wyposażonych w łącznik *o*-ditiobenzoilokarbamoilowy, zawierający w swojej konstytucji wiązanie disulfidowe, redukowane przez komórkowy glutation.

Wszystkie końcowe oraz pośrednie związki poddano analizie strukturalnej z wykorzystaniem technik spektroskopowych, m. in. spektroskopią ¹H NMR i ¹³C NMR oraz spektrometrią mas. Ponadto oznaczono ich czystość chemiczną przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Przeprowadzone badania właściwości biologicznych otrzymanych koniugatów wykazały, że obecność parasola molekularnego w różny sposób zmienia selektywną toksyczność amfoterycyny B i nystatyny. Wszystkie koniugaty nystatyny wykazywały znacznie niższą od macierzystego antybiotyku aktywność przeciwgrzybową, przy jednocześnie zwiększonej toksyczności wobec erytrocytów ludzkich. Z kolei wśród koniugatów amfoterycyny B, szczególnie korzystne właściwości wykazały te, w których łącznik parasol-antybiotyk zawierał 8 atomów węgla.

Otrzymane koniugaty parasoli molekularnych z FMDP i *cis*-pentacyną wykazywały słabą aktywność przeciwgrzybową lub brak takiej aktywności.

^a Z racji braku polskiego odpowiednika na określenie 'trimethyl lock', w dalszej części niniejszej rozprawy będzie ono stosowane w formie anglojęzycznej.



ROZDZIAŁ 3

3. Część teoretyczna

Patogeny grzybowe przez wiele dziesięcioleci postrzegane były jako stosunkowo niegroźne dla organizmu człowieka. Pogląd ten zmienił się jednak po II Wojnie Światowej, kiedy na szeroką skalę zaczęto poszukiwać i wprowadzać do praktyki medycznej antybiotyki o rozległym spektrum działania. Nieodpowiednie i nieprzemyślane stosowanie leków z tej grupy doprowadziło do powstania nowego zagrożenia ze strony niedocenianego przeciwnika – patogennych komórek grzybowych. Grzybnice zewnętrzne znane były już od najdawniejszych czasów, nie stanowiły i nie stanowią one jednak większego zagrożenia dla zdrowia i życia pacjentów ze względu na łatwą terapię schorzeń powodowanych przez patogeny je wywołujące. Szeroka gama preparatów o miejscowym działaniu powierzchniowym sprawdza się w zadowalającym stopniu w terapii grzybic zewnętrznych. Od około 30 lat poważne zagrożenie stanowią jednak grzybnice wewnętrzne (układowe). Nieodpowiednie stosowanie antybiotyków prowadzi do eliminacji naturalnej flory bakteryjnej pacjenta. W jego organizmie powstaje nisza ekologiczna, która z łatwością może zostać zasiedlona przez patogenne komórki grzybowe. Dodatkowo wzrost zachorowań na grzybnice wewnętrzne zauważa się wśród populacji ludzi z upośledzoną czynnością układu odpornościowego. Upośledzenia te mogą być powodowane obecnością w organizmie pacjenta wirusa HIV, który w sposób bezpośredni uszkadza komórki układu odpornościowego. Ponadto wzrost ryzyka wystąpienia grzybic układowych zauważa się u pacjentów przechodzących terapię przeciwnowotworową oraz terapię schorzeń autoimmunologicznych, gdzie w sposób celowy ogranicza się aktywność układu odpornościowego poprzez podawanie środków immunosupresyjnych. Obecnie, groźne dla życia ludzkiego, grzybnice układowe stanowią poważny problem przede wszystkim w krajach o wysokim poziomie opieki medycznej, a patogenami najczęściej atakującymi organizm człowieka są grzyby z rodzaju: *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium*, *Scopularopsis*, *Trichoderma* oraz *Mucor*. Pomimo wieloletnich badań nad tymi patogenami, chorobotwórcze grzyby są stosunkowo mało poznane. Z punktu widzenia chemoterapii patogeny grzybowe są trudnymi przeciwnikami ze względu na ich podobieństwo biochemiczne z komórkami ssaczymi. Podobieństwa te są przyczyną ograniczonej selektywnej toksyczności preparatów leczniczych, przez co obecnie stosowane chemoterapeutyki przeciwgrzybicze charakteryzują się wysoką toksycznością, zarówno



w stosunku do komórek patogenu, jak i komórek gospodarza. Obecnie trwają prace nad udoskonalaniem leków już istniejących, mające na celu redukcję toksyczności wobec komórek gospodarza oraz prace nad poszukiwaniem leków o nowych strukturach chemicznych, a także nowych celów działania.^{1,2}

3.1. Leki przeciwgrzybicze stosowane w praktyce klinicznej

Wszystkie komercyjnie wytwarzane i obecnie stosowane w praktyce klinicznej leki przeciwgrzybicze zaliczyć można do sześciu zasadniczych klas: (i) pochodnych azolowych, (ii) inhibitorów epoksydazy skwalenowej, (iii) pochodnych morfoliny, (iv) makrolidów polienowych, (v) kandyń oraz (vi) pochodnych cytozyny. Głównymi molekularnymi punktami uchwytu wspomnianych chemoterapeutyków przeciwgrzybiczych są: (i) szlak syntezy ergosterolu, (ii) szlak biosyntezy glikanów, (iii) szlak biosyntezy kwasów nukleinowych oraz (iv) sterole błony komórkowej.³

Leki przeciwgrzybicze z grupy **azol**, zarówno pochodne imidazolu, jak i triazyny, wykazują działanie grzybostatyczne na drodze hamowania biosyntezy ergosterolu będącego niezbędnym składnikiem błony komórkowej. Zawartość ergosterolu w błonie komórkowej grzybów wpływa na jej płynność, a odkładanie się nieprawidłowych steroli w biwarstwie lipidowej komórki skutkuje zaburzeniem funkcjonowania enzymów trwale z nią związanych. Przykładem takiego enzymu jest syntaza chityny, niezbędna w procesach wzrostowych i podziałach komórek grzybowych. Bezpośrednim celem molekularnym pochodnych azolowych jest demetylaza lanosterolu katalizująca reakcję demetylowania lanosterolu do 4,4-dimetylocholesta-8,14,24-trien-3-olu. Do ważniejszych preparatów tej grupy należą między innymi flukonazol (Rysunek 1).^{2,3}

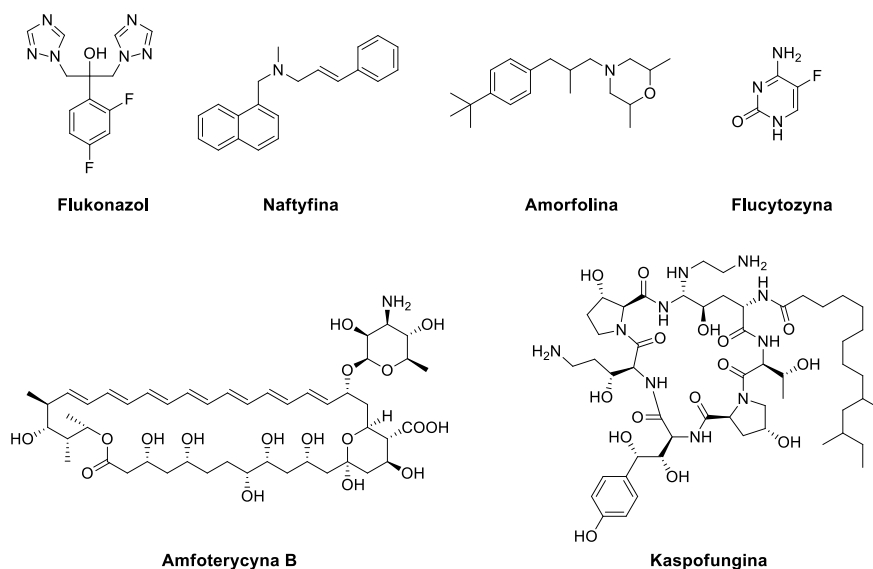
Do leków przeciwgrzybiczych działających jako inhibitory epoksydazy skwalenowej należą pochodne **amin allilowych**, hamujące syntezę ergosterolu na etapie biosyntezy lanosterolu. Podobnie jak pochodne azolowe wykazują działanie grzybostatyczne w wyniku niedoboru ergosterolu, mogą jednak wykazywać działanie grzybobójcze na skutek gromadzenia się w komórkach grzybowych dużych ilości skwalenu. Do najważniejszych leków tej grupy należą terbinafina oraz naftyfina (Rysunek 1).^{2,3}

Jedynym obecnie stosowanym lekiem z grupy pochodnych **morfoliny** jest amorfolina (Rysunek 1). Podobnie jak pochodne amin allilowych i pochodne azolowe, amorfolina hamuje syntezę ergosterolu, co wywołuje podobne skutki w procesach biochemicznych komórek grzybowych, jak w przypadku opisanych wcześniej preparatów.^{2,3}

W grupie **makrolidów polienowych** wspomnieć należy przede wszystkim o nystatynie A₁ oraz amfoterycynie B (Rysunek 1). Działanie obydwu leków polega na oddziaływaniu lipofilowych cząsteczek makrolidu ze składnikami błony komórkowej grzyba. Skutkuje to w rezultacie utworzeniem porów w błonie biologicznej patogenu, przez które swobodnie przemieszczają się kationy zaburzając tym samym polaryzację komórki. Preparaty z grupy makrolidów polienowych działają przede wszystkim grzybobójczo.^{2,3}

Substancje biologicznie czynne z rodzaju **kandyń** hamują syntezę 1,3-β-D-glukanu, będącego ważnym składnikiem ściany komórkowej grzybów. Jednym z półsyntetycznych przedstawicieli tej grupy związków jest lipopeptyd kaspofungina (Rysunek 1).^{2,3}

Flucytozyna jako pochodna cytozyny bierze udział w procesie biosyntezy kwasów nukleinowych. Zostaje ona przekształcona przez permeazę cytozynową w 5-fluorouracyl. Jego metabolit hamuje czynność syntetazy tymidylanowej i jako fałszywy metabolit zostaje włączony do struktury kwasów rybonukleinowych (Rysunek 1).^{2,3}



Rysunek 1. Struktury chemiczne komercyjnie dostępnych leków przeciwgrzybiczych obecnie stosowanych w praktyce klinicznej.

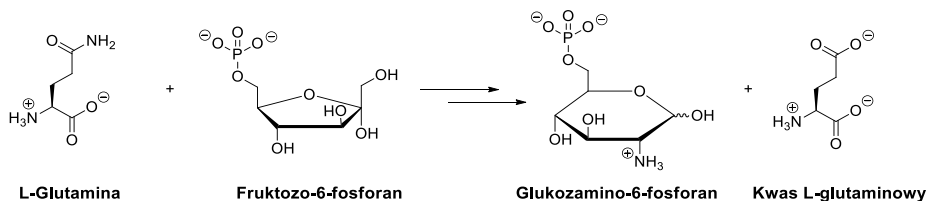
Wszystkie wspomniane chemoterapeutyki, mimo swojej aktywności przeciwgrzybiczej charakteryzują się jedną cechą wspólną – silną toksycznością nie tylko w stosunku do komórek patogenu, ale także ssących komórek gospodarza. Istnieje więc ciągła potrzeba poszukiwania nowych leków przeciwgrzybiczych lub modyfikowania już istniejących w kierunku ulepszenia ich toksyczności selektywnej. Obecny trendem jest także poszukiwanie nowych celów molekularnych w patogennych komórkach grzybowych, nieobecnych w komórkach ssących.

3.2. Syntaza glukozamino-6-fosforanu – cel molekularny nowej klasy potencjalnych leków przeciwgrzybiczych

Syntaza glukozamino-6-fosforanu (GlcN-6-P) jest enzymem należącym do grupy amidotransferaz. Enzym ten katalizuje nieodwracalną reakcję transferu grupy aminowej z L-glutaminy na fruktozo-6-fosforan (Fru-6-P) oraz proces izomeryzacji do glukozamino-6-fosforanu (Rysunek 2). Obecnie istnieją dwie teorie mechanizmu deaminowania L-glutaminy przez syntazę GlcN-6-P, przy czym obie z nich zakładają atak nukleofilowy reszty tiolowej Cys1 na resztę amidową glutaminy. Według jednej z nich w pierwszym etapie reakcji dochodzi do aktywowania reszty –SH Cys1 przez cząsteczkę wody co skutkuje zwiększeniem nukleofilowości atomu siarki w Cys1. W następnym kroku dochodzi do ataku zaktywowanego ugrupowania tiolowego na funkcję amidową glutaminy stabilizowanej

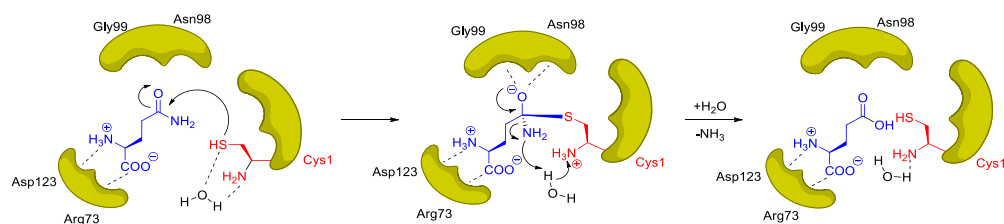


przez Asp123 oraz Arg73, co skutkuje utworzeniem tetraedrycznego stanu przejściowego dodatkowo stabilizowanego przez Gly99 oraz Asn98.



Rysunek 2. Schematyczna reprezentacja reakcji transferu grupy aminowej na fruktozo-6-fosforan oraz izomeryzacji do glukozamino-6-fosforanu katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P.

W kolejnym etapie ma miejsce odtworzenie ugrupowania karbonylowego, przy jednoczesnej eliminacji cząsteczki amoniaku, a powstały tioester kwasu glutaminowego zostaje zhydrolizowany przez kolejną cząsteczkę wody, co w konsekwencji prowadzi do uwolnienia cząsteczki kwasu glutaminowego oraz regeneracji grupy tiolowej Cys1 w centrum aktywnym enzymu (Rysunek 3).^{4,5}

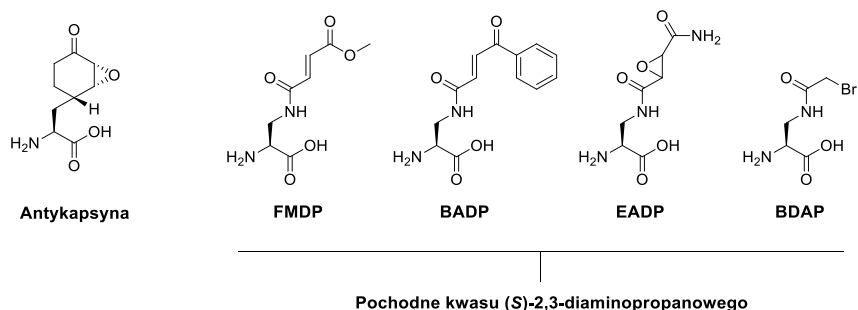


Rysunek 3. Uproszczony mechanizm deaminowania glutaminy do kwasu glutaminowego, katalizowany przez syntazę GlcN-6-P.

Opisany etap deaminowania kwasu glutaminowego do glutaminy, a przede wszystkim etap ataku nukleofilowego ugrupowania tiolowego Cys1 na układ acylowy glutaminy leży u podstaw aktywności inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu. Obecnie znanych jest kilkanaście związków funkcjonujących jako inhibitory syntazy GlcN-6-P. Podzielić można je na dwie główne kategorie: (i) związki chemiczne o szerokiej różnorodności struktur, nie będące analogami substratu oraz (ii) związki będące analogami substratu. Uwzględniając fakt, że reszta tiolowa Cys1 uczestniczy w procesie katalizy enzymatycznej jako centrum nukleofilowe, do pierwszej klasy inhibitorów zaliczyć można takie indywidualia chemiczne, jak rodniki tlenowe czy też małe związki alkilujące, jak na przykład *N*-etylomaleimid oraz jodoacetamid, które pozbawiają lub silnie ograniczają aktywności nukleofilową atomu siarki Cys1.^{4,6}

Istnieje stosunkowo szeroka gama poznanych związków pełniących funkcje inhibitorów syntazy GlcN-6-P na zasadzie analogów jednego z substratów – L-glutaminy. Znajdują się wśród nich substancje oddziałujące na enzym w sposób selektywny, nie wpływając na aktywność innych amidotransferaz. Zaliczyć do nich możemy antykapsynę oraz syntetyczne pochodne kwasu (S)-2,3-diaminopropanowego (Rysunek 4).

Szczególną aktywnością w stosunku do syntazy GlcN-6-P odznacza się jedna z pochodnych kwasu (S)-2,3-diaminopropanowego, kwas (S)-N³-(4-metoksyfumariloilo)-2,3-diaminopropanowy (FMDP). Pochodna ta oddziałuje z centrum aktywnym syntazy GlcN-6-P, tworząc nieodwracalne, kowalencyjne połączenie z Cys1 w centrum aktywnym odpowiedzialnym za proces deaminowania kwasu glutaminowego. Mechanizm inhibicji z udziałem FMDP został stosunkowo dobrze poznany dzięki technikom modelowania molekularnego i przedstawia się następująco. W początkowym etapie cząsteczka FMDP zostaje zlokalizowana w centrum aktywnym enzymu podobnie, jak L-glutamina, poprzez stabilizowanie ze strony Asp123 oraz Arg73.

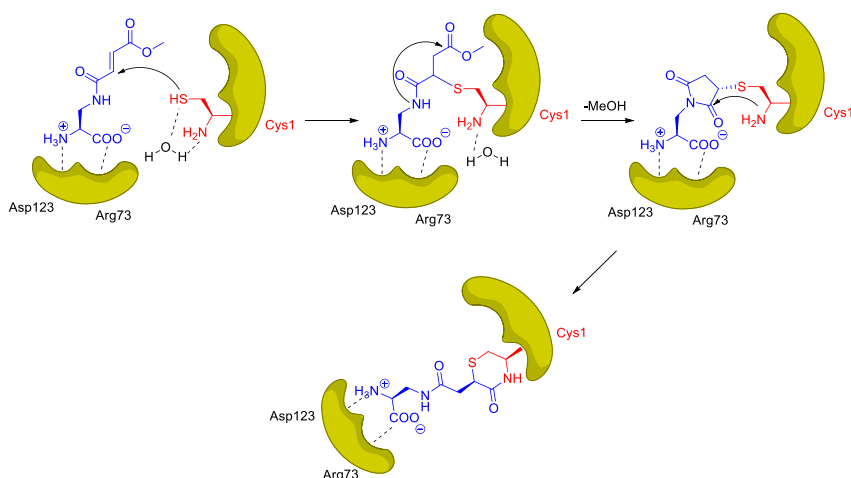


Rysunek 4. Syntetyczne analogi substratu syntazy GlcN-6-P.

Następnie reszta tiolowa Cys1, aktywowana cząsteczką wody, atakuje nukleofilowo cząsteczkę związanego substratu. Inaczej niż w przypadku L-glutaminy – atak następuje na wiązanie podwójne reszty fumaroilowej FMDP. Na skutek addycji nukleofilowej do układu sprzężonego, dochodzi do utworzenia trwałego wiązania kowalencyjnego, po którym ma miejsce wewnątrzcząsteczkowa reakcja cyklizacji, będąca efektem ataku amidowego atomu azotu FMDP na ugrupowanie estrowe zlokalizowane w tej cząsteczce. Pięciocząonowy pierścieniowy produkt pośredni ulega ekspansji do sześciocząonowego na skutek aktywności grupy aminowej Cys1, której atom azotu uczestniczy w strukturze ostatecznego indywiduum trwale blokującego centrum aktywne syntazy GlcN-6-P (Rysunek 5).^{4,7}

FMDP mimo swojej wysokiej aktywności biologicznej w stosunku do syntazy GlcN-6-P, wykazuje silnie ograniczoną zdolność penetracji w poprzek błony komórkowej patogennych grzybów. Na przestrzeni lat przeprowadzono różne próby modyfikacji cząsteczki FMDP celem zwiększenia jej zdolności do przenikania przez biwarstwę lipidową przy jednoczesnym zachowaniu aktywności biologicznej. Modyfikacje te to m.in.: przeprowadzona przez Chmarę i współpracowników⁸ synteza połączeń dipeptydowych FMDP z aminokwasami na C lub N-końcu łańcucha peptydowego, zakładająca wykorzystanie transportu za pośrednictwem błonowych permeaz czy synteza pochodnych FMDP o zwiększonej lipofilowości, której założeniem było wykorzystanie transportu biernego. Wyniki badań biologicznych wykazały jednak, że modyfikacje te albo powodują znaczny spadek aktywności biologicznej, albo przy zachowaniu aktywności stają się nieskuteczne w dłuższym okresie ze względu na blokowanie przez komórki grzybowe transportu permeazowego.^{8,9}





Rysunek 5. Mechanizm procesu dezaktywacji centrum aktywnego syntazy GlcN-6-P przez cząsteczkę FMDP.

W związku z powyższym ciągle istnieje potrzeba optymalizacji procesu transportu FMDP do wnętrza komórek grzybowych. Pomocna w tym przypadku może okazać się idea transportu przy wsparciu nanośników ułatwiających transport w poprzek błony komórkowej.

3.3. Nanośniki – „narzędzia” ułatwiające transport przez błonę lipidową

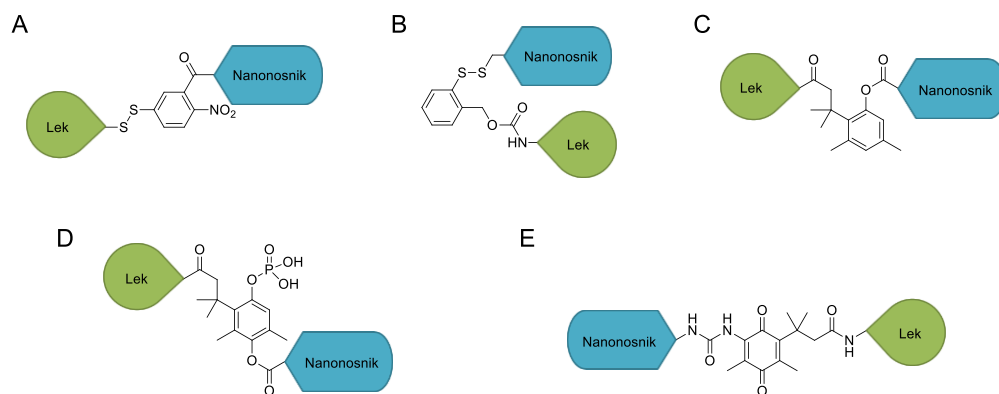
Na przestrzeni lat wypracowano wiele układów umożliwiających transport substancji aktywnych do wnętrza komórek nowotworowych i patogennych mikroorganizmów. Wśród tych układów znajdują się struktury nanośników – związków o ściśle zdefiniowanej budowie, do których przyłączane mogą być cząsteczki substancji o pożądanych właściwościach biologicznych. Cechą charakterystyczną nanośników jest ich zdolność do przenikania błony biologicznej, której mechanizm zależy od struktury transportera. Badania prowadzone przez ostatnie dziesięciolecie doprowadziły do opracowania stosunkowo szerokiej gamy efektywnych nośników dla substancji aktywnych, niezdolnych do samodzielnego przekraczania barier lipidowych. Do najczęściej wspominanych w literaturze zaliczyć można: nanorurki, dendrymery, peptydy penetrujące, siderofory, etery koronowe, fulereny, nanocząstki złota i srebra, nanocząstki hydrożelu oraz parasole molekularne. Idea wykorzystania cząsteczek nanośnika opiera się o generowanie oddziaływań między cząsteczką aktywną a cząsteczką transportera, które to oddziaływania umożliwiają efektywny transport przez błonę oraz uwalnianie cząsteczek transportowanych na drodze zaniku tych oddziaływań w środowisku cytoplazmy komórek docelowych. Oddziaływania nanośnik-cząsteczka aktywna biologicznie generowane mogą być w dwojaki sposób: (i) na drodze oddziaływań niekwalencyjnych, np.: oddziaływania π - π lub oddziaływania hydrofobowe lub (ii) na drodze oddziaływań kowalencyjnych poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych. Zdecydowanie częściej wykorzystywane jest drugie



podejście i sprowadza się ono do stosowania specyficznych łączników pośredniczących między strukturami nanoonośnika i cząsteczki transportowanej.

3.3.1. Strategia „Konia Trojańskiego” w transporcie substancji aktywnych

Strategia „Konia Trojańskiego” transportu substancji aktywnych do wnętrza komórek oparta jest o ideę łączenia cząsteczki transportowanej ze strukturą nanoonośnika w układ zdolny do przenikania przez błony biologiczne. Układ ten po przeniknięciu do wnętrza komórki ulega rozpadowi, uwalniając przy tym cząsteczkę aktywną, która może osiągnąć swój cel wewnątrzkomórkowy – zazwyczaj jest to określona biomolekuła. Sposób uwalniania cząsteczki transportowanej uzależniony jest natomiast od sposobu połączenia z cząsteczką nanoonośnika. Najczęstszym sposobem łączenia jest tworzenie trwałych wiązań kowalencyjnych pomiędzy cząsteczką aktywną a strukturą nanoonośnika. W nielicznych przypadkach wystarczającym jest bezpośrednie połączenie za pomocą wiązań rozpoznawanych i hydrolizowanych przez enzymy wewnątrzkomórkowe. Często jednak utworzenie bezpośrednich połączeń nie przynosi oczekiwanych rezultatów lub jest niemożliwe do wykonania ze względu na strukturę chemiczną, zarówno nanoonośnika, jak i cząsteczki substancji aktywnej. Na przestrzeni lat opracowano wiele użytecznych połączeń rozwiązujących problem uwalniania cząsteczki aktywnej w środowisku cytoplazmy, przy jednoczesnym zachowaniu stabilności układu transportującego w środowisku pozakomórkowym. Niektóre z najbardziej interesujących rozwiązań przedstawiono na Rysunku 6. Często wykorzystywanym układem obecnym w strukturach łączników jest ugrupowanie disulfidowe (Rysunek 6A i B), ulegające w środowisku cytoplazmy reakcji podstawienia cząsteczką glutationu, co prowadzi do uwolnienia cząsteczki ‘ładunku’.



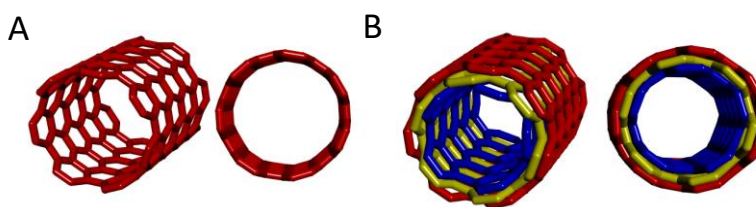
Rysunek 6. Przykłady labilnych łączników pośredniczących między strukturą nanoonośnika i cząsteczki aktywnej. (A) łącznik oparty o strukturę aktywowanego disulfidu; (B) łącznik *o*-ditiobenzoilokarbamoilowy; (C-E) łączniki ‘trimethyl lock’.

Wadą układów disulfidowych jest jednak konieczność występowania w strukturze chemicznej cząsteczki ‘ładunku’ ugrupowania tiolowego, umożliwiającego utworzenie wiązania disulfidowego. Innym podejściem jest zastosowanie łączników zawierających reszty estrowe (Rysunek 6C), rozpoznawane przez komórkowe esterazy. W tej grupie łączników szczególnie interesujący jest układ ‘trimethyl lock’, ulegający reakcji laktonizacji

na skutek aktywności komórkowych esteraz. Jako „narzędzia” uwalniające cząsteczki transportowane wykorzystano także fosfatazy, zdolne do hydrolizy wiązań estrowych kwasu fosforowego oraz oksydoreduktazy, katalizujące reakcje utleniania i redukcji. Dwa wspomniane enzymy zdolne są do lizy odpowiednio zmodyfikowanych układów ‘trimethyl lock’, powodując uwolnienie cząsteczki transportowanej (Rysunek 6D i E). Dużym zainteresowaniem w tworzeniu połączeń nanonośników z cząsteczkami leków z zastosowaniem specyficznych łączników, cieszą się przede wszystkim: nanorurki, dendrymery, peptydy penetrujące, siderofory i parasole molekularne.¹⁰

3.3.2. Nanorurki

Mianem nanorurek (CNT, *ang.* Carbon **N**anotubes) określa się struktury węgla ukształtowane w formę pustego w środku cylindra. Nanorurki, ze względu na swoją strukturę, sklasyfikowane zostały do dwóch podstawowych typów: (i) nanorurki jednościenne (SWCNT, *ang.* Single-walled carbon nanotubes) – zbudowane są z pojedynczej warstwy grafenu zwiniętej w formę cylindra oraz (ii) nanorurki wielościenne (MWCNT, *ang.* Multi-walled carbon nanotubes), które zawierają w swojej strukturze zwielokrotnioną liczbę warstw grafenu, uformowanych w postaci koncentrycznych cylindrów oddalonych od siebie o około 0.34 nm (Rysunek 7).



Rysunek 7. Schematyczna reprezentacja rodzajów nanorurek. (A) nanorurki jednościenne, (B) nanorurki wielościenne.

Nanorurki ze względu na swoje właściwości fizyczne, takie jak: niewielkie rozmiary i hydrofobowy charakter, wykazują zdolność do penetracji w poprzek biwarstwy lipidowej. Stanowią one swego rodzaju „nanoigły” przebijające warstwę lipidową, co umożliwia im wnikanie do wnętrza komórki. Zjawisko to leży u podstaw wykorzystania nanorurek jako transporterów substancji aktywnych do wnętrza komórek. Nanorurki z racji swojej budowy, wykorzystywane są w transporcie substancji w dwojaki sposób. Pierwszy z nich to wykorzystanie nanorurki jako „kontenera”, do którego wnętrza wprowadzana jest cząsteczka transportowana; zaznaczyć należy że ten sposób transportu realizowany może być tylko na drodze oddziaływań niekowalencyjnych. Znacznie częściej wykorzystywaną techniką jest przyłączanie cząsteczek transportowanych do zewnętrznej ściany nanorurki. Metoda ta polega na tworzeniu wiązań kowalencyjnych między cząsteczką, która ma być transportowana i zewnętrzną ścianą nanorurki lub realizowana może być na drodze oddziaływań hydrofobowych lub/i oddziaływań π - π ze względu na aromatyczny charakter nanorurek.¹¹

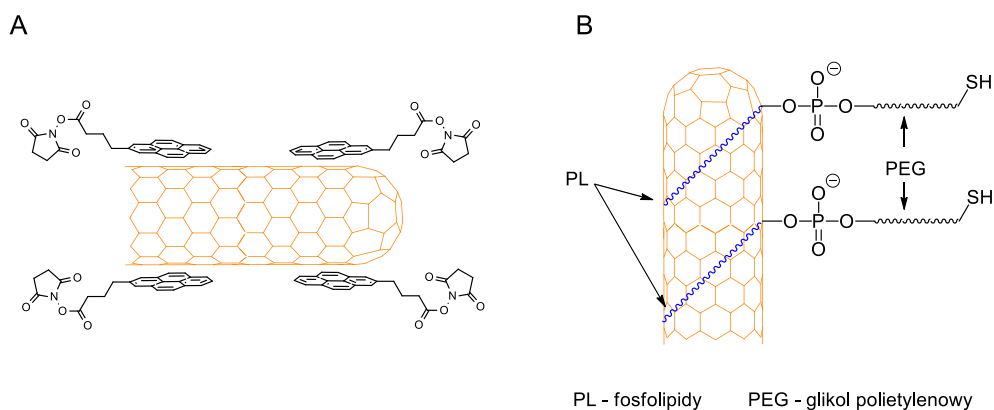


Nanorurki, w swojej pierwotnej formie, nie posiadają żadnych grup funkcyjnych umożliwiających tworzenie wiązań kowalencyjnych. O ile nie stanowi to problemu, gdy cząsteczka ładunku oddziałuje z nanorurką w sposób niekowalencyjny, o tyle utworzenie wiązania z nanorurką może stanowić pewne wyzwanie. W celu rozwiązania problemu tworzenia wiązań kowalencyjnych ze strukturą nanorurki opracowano szereg metod ich funkcjonalizacji.

3.3.2.1. Funkcjonalizowanie nanorurek

Głównym ograniczeniem stosowania nanorurek (SWCNT i MWCNT) w układach biologicznych jest ich całkowity brak rozpuszczalności w typowych rozpuszczalnikach lipofilowych i hydrofilowych. Przez ostatnie dwadzieścia lat liczne grupy badawcze wypracowały kilka znaczących technik chemicznej modyfikacji, które umożliwiły przeprowadzenie nanorurek w formy rozpuszczalne w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych, co zaowocowało możliwością ich potencjalnego zastosowania w układach biologicznych. Dwa główne podejścia derywatyzyjne to: (i) funkcjonalizacja niekowalencyjna i (ii) funkcjonalizacja kowalencyjna.

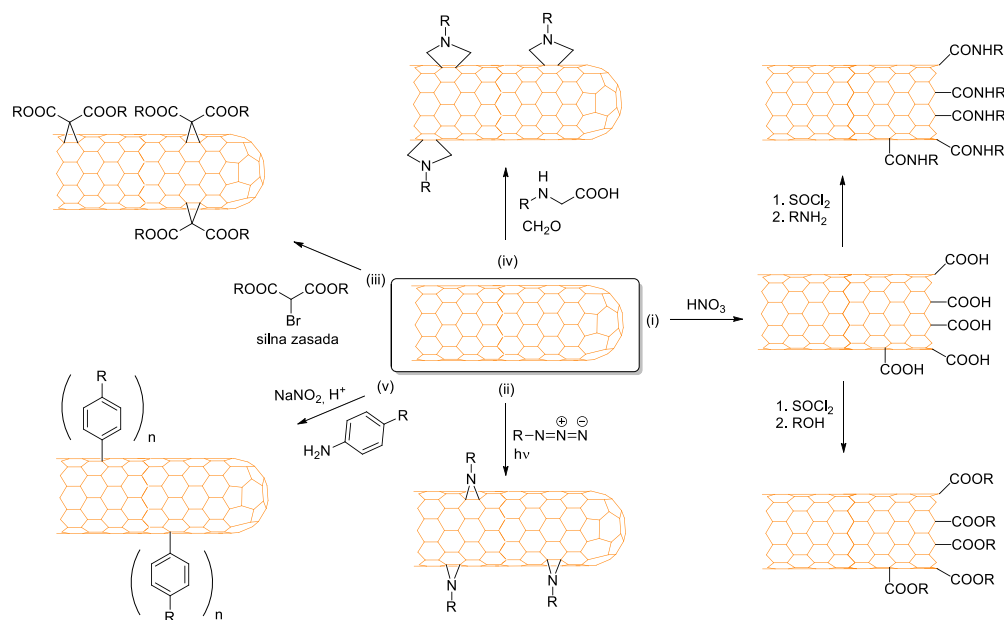
Funkcjonalizacja niekowalencyjna jest podejściem, w którym nie zostaje zaburzona struktura aromatyczna nanorurki. Cząsteczki o charakterze amfifilowym, wykorzystywane w tej technice, oddziałują ze strukturą aromatyczną ściany nanorurki na drodze oddziaływań π - π lub hydrofobowych, tworząc przy tym swoistego rodzaju kotwicę umożliwiającą immobilizację cząsteczki ładunku.¹² Za dobry przykład takiego niekowalencyjnego połączenia mogą posłużyć wyniki badań Chena i współpracowników,¹³ którzy otrzymali niekowalencyjne koniugaty ugrupowań *N*-hydroksysukcynimidowych z cząsteczkami nanorurek. W podejściu tym wykorzystany został hydrofobowy charakter aromatycznych ugrupowań pirenu, tworzących kotwicę kontaktującą się ze ścianą nanorurki na drodze oddziaływań π - π . Ugrupowanie odpowiadające za rozpuszczalność pochodnych oraz stanowiące miejsce modyfikacji umożliwiające przyłączenie cząsteczki ładunku stanowi ugrupowanie estru aktywnego NHS (Rysunek 8A).¹³



Rysunek 8. Różne sposoby funkcjonalizacji niekowalencyjnej. (A) oddziaływania π - π ; (B) oddziaływania hydrofobowe.

Innym dogodnym indywidualum umożliwiającym niekowalencyjne zakotwiczenie cząsteczek aktywnych biologicznie na ścianach nanorurek są fosfolipidy. Związki te wykazują silny charakter amfifilowy, spowodowany obecnością polarnych reszt fosforanowych oraz lipofilowych ugrupowań węglowodorowych. Część lipofilowa wykazuje zdolność do oddziaływania z niepolarnymi ścianami nanorurek na drodze oddziaływań hydrofobowych. Natomiast polarne ugrupowania fosforanowe, najczęściej modyfikowane łańcuchami glikolu polietylenowego posiadającymi na swych końcach reaktywne ugrupowania tiolowe, umożliwiają przyłączanie innych cząsteczek (Rysunek 8B).¹⁴

Alternatywą dla technik niekowalencyjnych funkcjonalizacji nanorurek są metody **kowalencyjne**. Metody te wykorzystują reakcje chemiczne prowadzące do otrzymania pochodnych zawierających grupy funkcyjne na ścianach nanorurek. Metody te związane są z zaburzeniem lokalnego aromatycznego charakteru nanorurek. Wśród wielu wypracowanych technik do najważniejszych i najszerzej stosowanych zaliczyć można: (i) utlenianie w środowisku silnego kwasu, (ii) [1+2]-cykloaddycję azydów indukowaną promieniowaniem świetlnym, (iii) reakcję Bingela, (iv) 1,3-dipolarną cykloaddycję oraz (v) sprzężanie z wykorzystaniem soli diazoniowych (Rysunek 9).

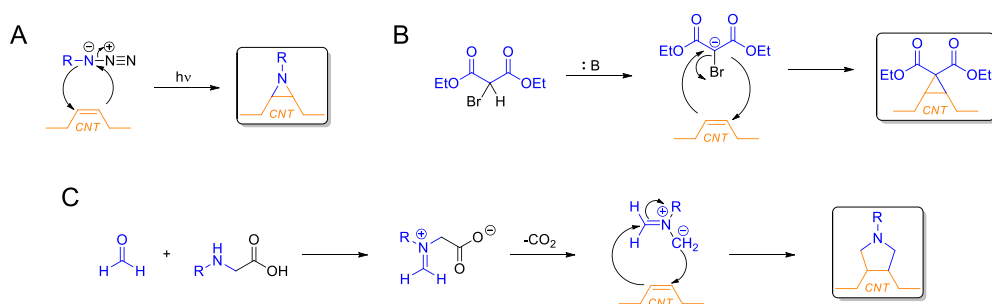


Rysunek 9. Najczęściej wykorzystywane techniki kowalencyjnej modyfikacji nanorurek: (i) utlenianie silnym kwasem, (ii) addycja [1+2] azydów indukowana promieniowaniem świetlnym, (iii) reakcja Bingela, (iv) 1,3-dipolarna cykloaddycja, (v) reakcja bezrozpuszczalnikowa z zastosowaniem soli diazoniowych.

Najstarszą i jednocześnie najprostszą techniką modyfikacji nanorurek, prowadzącą do zwiększenia ich rozpuszczalności, jest utlenianie silnymi kwasami nieorganicznymi, np.: kwasem azotowym(V) (Rysunek 9i). Traktowanie nanorurek silnym czynnikiem utleniającym prowadzi do częściowej degradacji struktury nanorurki związanej z procesem utleniania atomów węgla do reszt karboksylowych. Utlenianie to zachodzi najszybciej na końcach zamkniętych nanorurek z racji znacznych naprężeń występujących w tych

fragmentach nanorurki. Produktem procesu utleniania są grupy karboksylowe zlokalizowane w znakomitej większości na końcach nanorurki. Mogą one zostać następnie przekształcone w szereg pochodnych kwasów karboksylowych, co daje bardzo szerokie spektrum możliwości syntetycznych.¹⁵

Jednymi z najszerzej stosowanych technik funkcjonalizacji są reakcje cykloaddycji zachodzące na aromatycznych ścianach nanorurek. Trzy najczęściej stosowane do tego celu metody wykorzystujące reakcje cykloaddycji to: [2+1]-cykloaddycja układów azydowych, reakcja Bingela oraz 1,3-dipolarna cykloaddycja ylidów azotowych. Pierwsza ze wspomnianych technik (Rysunek 9ii) w odniesieniu do nanorurek została zaproponowana przez Moghaddama i współpracowników.¹⁶ Reakcja tworzenia wiązania polega w tym przypadku na indukowanej promieniowaniem świetlnym addycji pochodnych azydowych do powierzchni nanorurki, co wiąże się z utratą charakteru aromatycznego w miejscu tworzenia trójcłonowego pierścienia (Rysunek 10A).¹⁶

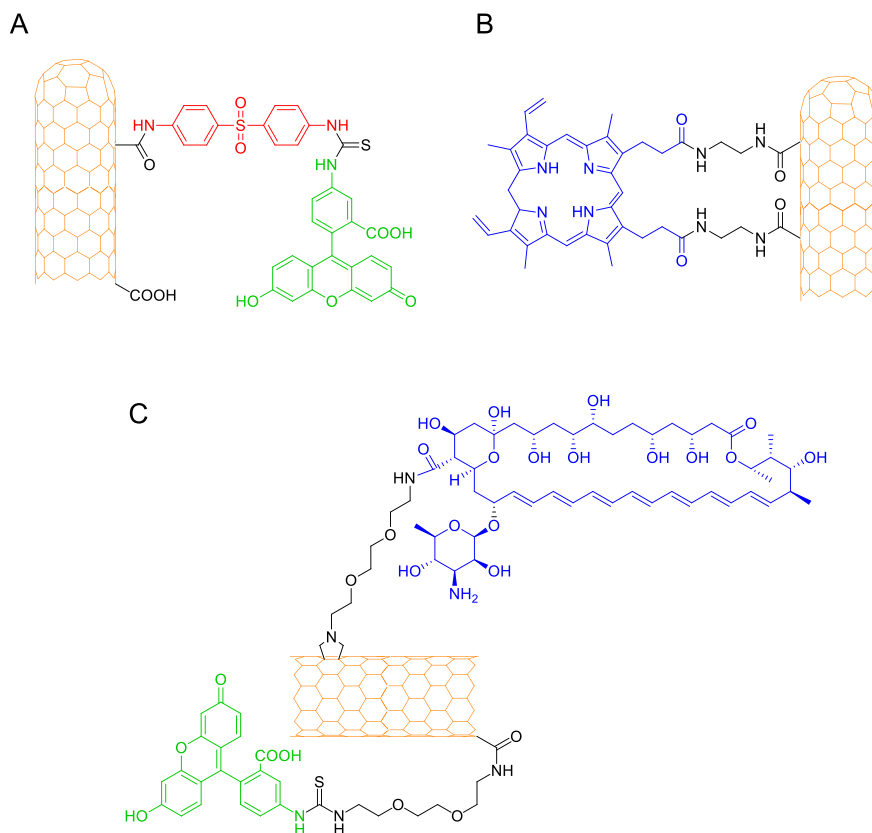


Rysunek 10. Przykładowe reakcje cykloaddycji wykorzystywane w procesie funkcjonalizacji nanorurek. (A) [2+1]-cykloaddycja azydów; (B) reakcja Bingela; (C) 1,3-dipolarna cykloaddycja ylidów azotowych.

Dругa technika opierająca się o proces [2+1] cykloaddycji to reakcja Bingela (Rysunek 9iii). Reakcja ta polega na tworzeniu, podobnie jak w poprzednim przypadku, trójcłonowego pierścienia, którego dwa atomy węgla pochodzą od ściany nanorurki. Natomiast trzeci atom węgla jest fragmentem malonianu dietylu. W najprostszym wariantcie reakcję Bingela przeprowadza się z wykorzystaniem 2-halogenopochodnej malonianu dietylu w obecności silnej zasady. Silna zasada odrywając atom wodoru z pozycji α malonianu dietylu generuje karboanion, który tworzy wiązanie kowalencyjne z układem aromatycznym nanorurki. Bogaty w elektrony układ aromatyczny tworzy jednocześnie na drodze substytucji nukleofilowej, wiązanie kowalencyjne z atomem węgla α malonianu dietylu. Tak utworzone połączenie może być następnie modyfikowane na obecnych w układzie ugrupowaniach estrowych (Rysunek 10B).¹⁷ Jednak zdecydowanie najpowszechniej stosowaną reakcją cykloaddycji wykorzystywaną w funkcjonalizacji nanorurek jest 1,3-dipolarna cykloaddycja, przebiegająca z wykorzystaniem ylidów azotowych generowanych w reakcji aldehydu z *N*-alkilowaną pochodną aminokwasową. Produktem reakcji jest pięciocłonowy układ pirolidyny z pożądaną grupą funkcyjną ulokowaną na atomie azotu (Rysunek 10C).¹⁸

Otrzymywanie pochodnych nanorurek zawierających modyfikowalne ugrupowania chemiczne jest kluczowym etapem tworzenia koniugatów z innymi cząsteczkami, najczęściej substancji biologicznie czynnych. Tworzenie połączeń nanorurek z substancjami aktywnymi

cieszy się wielkim powodzeniem, co odzwierciedla się w mnogości związków otrzymanych z udziałem węglowych rurek. Wspomnieć należy tu o ich koniugatach z peptydami i białkami^{19,20,21,22,23,24} oraz kwasami nukleinowymi, zarówno DNA, jak i RNA.^{25,26,27,28,29} Największą popularnością cieszą się jednak połączenia nanorurek z substancjami o aktywności przeciwnowotworowej, których rozmiary i stopień polarności silnie ograniczają zdolność do dyfuzji przez błonę biologiczną. W Tabeli 1 przedstawiono przykładowe połączenia nanorurek ze związkami o aktywności przeciwnowotworowej, natomiast na Rysunku 11 przykłady połączeń kowalencyjnych z cząsteczką nanorurki.



Rysunek 11. Przykłady połączeń kowalencyjnych nanorurek z cząsteczkami: (A) dapsonu i fluoresceiny; (B) układu porfirynowego; (C) amfoterycyny B i fluoresceiny.

Tabela 1. Przykłady zastosowania nanorurek w transporcie leków przeciwnowotworowych.

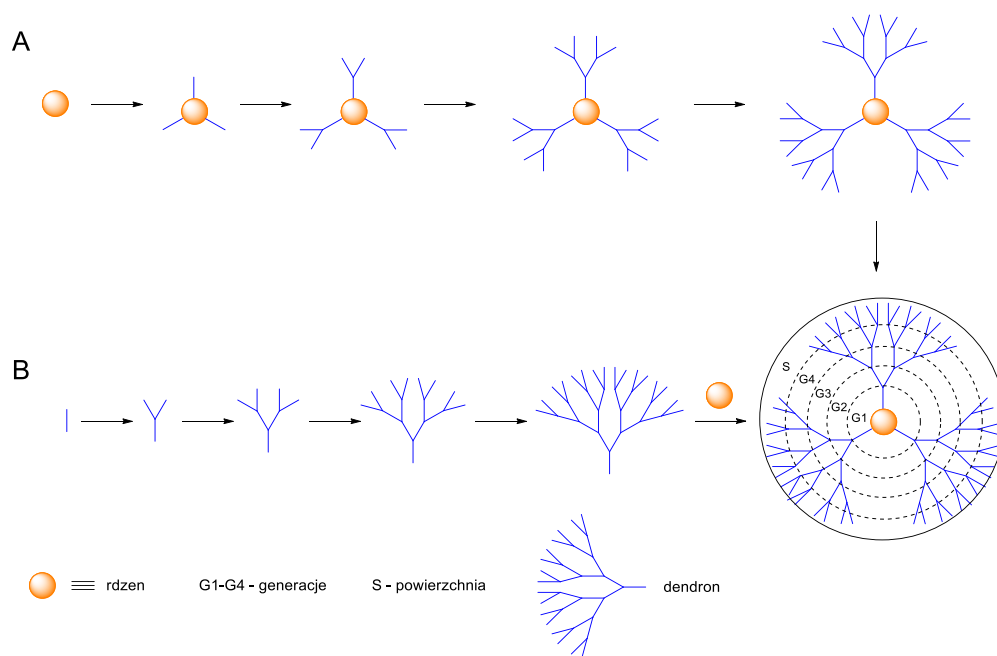
Cząsteczka aktywna	Typ nanorurki i modyfikacji	Badania biologiczne	Lit.
Doksorubicyna	SWCNT, kowalencyjna	<i>In vitro</i> , komórki HeLa	30
		<i>In vitro</i> , nowotwór jelita grubego	31
	SWCNT, niekowalencyjna	<i>In vitro</i> , mysz czarniak	32
		<i>In vivo</i> , mysz	
		<i>In vitro</i> , białaczki	33
Cisplatyna	SWCNT, niekowalencyjna	<i>In vitro</i> , glejak	34
		<i>In vitro</i> , nowotwór piersi	35
		<i>In vitro</i> , nowotwór jądra	36
Gemcytabina	SWCNT, niekowalencyjna	<i>In vitro</i> , komórki kosmówczaka	37
		<i>In vivo</i> , szczury	38



Metotreksat	MWCNT, kowalencyjna	<i>In vitro</i> , nowotwór piersi <i>In vitro</i> , limfocyty T	39 40
Paklitaksel	SWCNT, niekowalencyjna	<i>In vitro</i> , nowotwór piersi <i>In vivo</i> , nowotwór piersi	41
Karboplatyna	MWCNT, kowalencyjna MWCNT, niekowalencyjna	<i>In vitro</i> , nowotwór płuc i jajnika <i>In vitro</i> , nowotwór pęcherza moczowego	42 43
Kamptotecyna	MWCNT, kowalencyjna	<i>In vitro</i> , nowotwór żołądka	44

3.3.3. Dendrymery

Dendrymery to polimeryczne związki o ściśle określonej strukturze chemicznej. Cechą charakterystyczną dendrymerów jest ich silnie rozbudowana struktura przestrzenna, której podstawą jest tak zwany rdzeń, otoczony przez jedną lub wiele rozgałęzionych warstw zwanych generacjami (Rysunek 12).^{45,46,47}



Rysunek 12. Dwie główne metody syntezy dendrymerów. (A) metoda dywergentna; (B) metoda konwergentna.

3.3.3.1. Metody otrzymywania dendrymerów

Syntezę dendrymerów przeprowadza się na ogół zgodnie z jedną z dwóch wypracowanych i dobrze opisanych metod. Pierwszą z nich jest metoda dywergentna, opracowana przez Tomalię i współpracowników,⁴⁸ polegająca na rozbudowywaniu struktury dendrymeru, poczynając od cząsteczki rdzenia. Seria następujących po sobie reakcji tworzenia kolejnych generacji prowadzi do przestrzennej ekspansji cząsteczki, w wyniku czego otrzymuje się dendrymery o pożądanej strukturze i wielkości (Rysunek 12A).⁴⁸

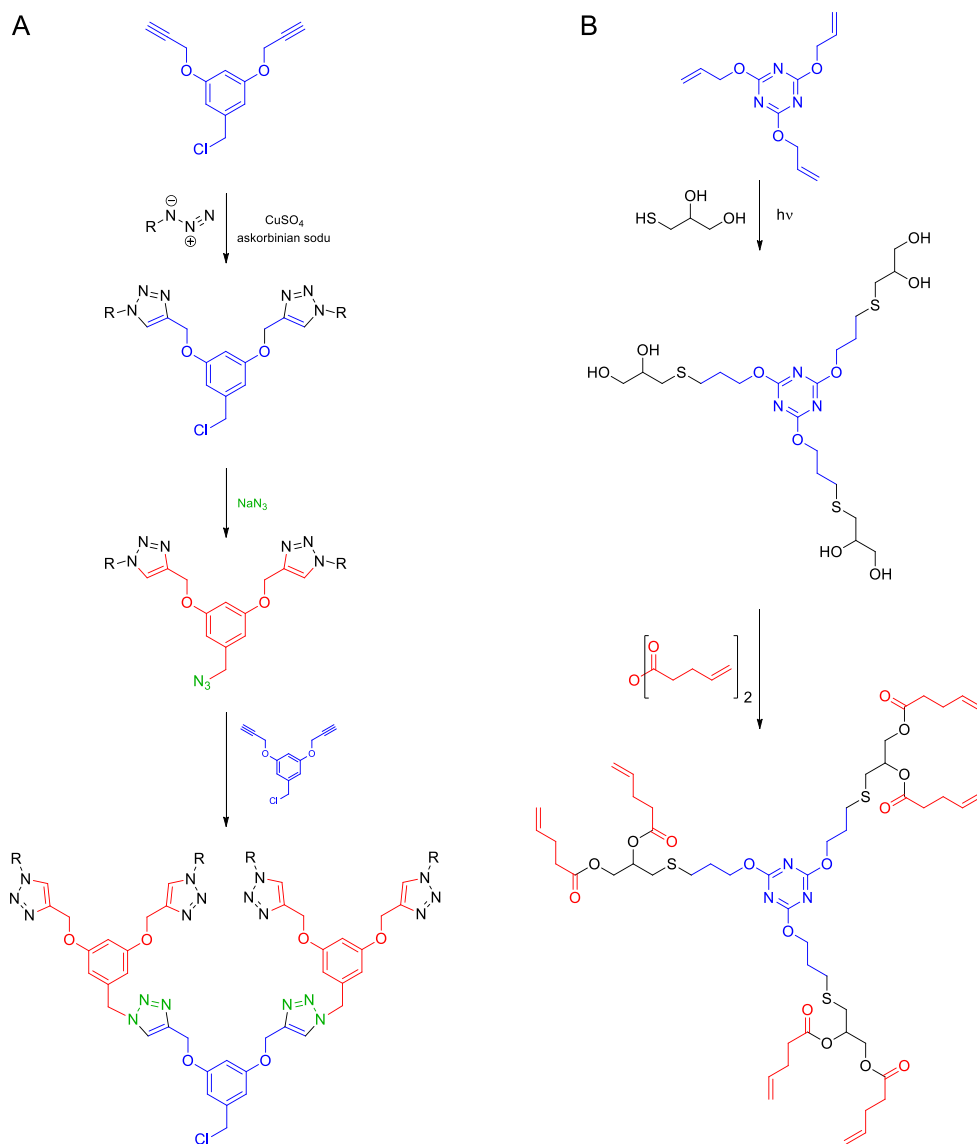
Drugim najczęściej stosowanym podejściem w syntezie dendrymerów jest opracowana przez Hawkera i Frecheta⁴⁹ metoda konwergentna. W przeciwieństwie do



techniki dywergentnej, synteza dendrymeru rozpoczyna się na peryferiach docelowej cząsteczki i przebiega w kierunku rdzenia na drodze łączenia tworzonych kolejnych generacji. W większości przypadków zastosowanie metody konwergentnej sprowadza się do otrzymywania struktur dendronów i sprzęgania ich z cząsteczką rdzenia (Rysunek 12B).⁴⁹

Obok wcześniej wspomnianych metod dywergentnej i konwergentnej, opracowano także szereg innych podejść syntetycznych mających na celu przede wszystkim zmniejszenie liczby reakcji wymaganych do otrzymania zamierzonego dendrymeru oraz zwiększenie wydajności procesu. Nanjwade i współpracownicy⁵⁰ opisują metodę, która polega na jednoczesnej rozbudowie rdzenia dendrymeru, jak i dendronów (*ang.* „hypercore and branched monomers growth”), co w znaczny sposób przyspiesza syntezę pożądanych dendrymerów.⁵⁰ Jednym z najmłodszych podejść do omawianej problematyki syntezy dendrymerów jest propozycja „Lego” Maravala i współpracowników,⁵¹ która w swym założeniu wykorzystuje reakcje pomiędzy bardzo reaktywnym rdzeniem i rozgałęzionymi monomerami opierającymi się o pochodne hydrazyny oraz fosfiny, prowadząca do otrzymania dendrymerów fosforowych, umożliwiających przyrost kolejnych generacji w silnie zredukowanej liczbie etapów w porównaniu z metodami klasycznymi. Metoda opracowana przez Maravala umożliwia między innymi zwielokrotnienie liczby peryferyjnych grup funkcyjnych z 48 do 250 w tylko jednym etapie, przy czym głównymi produktami ubocznymi prowadzonych reakcji są niemal wyłącznie woda oraz gazowy azot.⁵¹ W syntezie dendrymerów zastosowanie znalazło także tak zwane „click chemistry”,² czyli metoda syntezy opierająca się o reakcje zachodzące ilościowo i bez konieczności późniejszego oczyszczania produktu. To podejście zostało zaproponowane między innymi przez Wu i współpracowników,⁵² wykorzystujących reakcje syntezy 1,2,3-triazoli na drodze [2+3]-cykloadycji azydów oraz alkinów katalizowane jonami miedzi(I) (Rysunek 13A). Metoda ta dobrze sprawdza się w otrzymywaniu dendrymerów drugiej oraz trzeciej generacji bez późniejszego ich oczyszczania na drodze chromatografii kolumnowej. Ponadto jedynym produktem ubocznym przeprowadzanych reakcji jest sól nieorganiczna – chlorek sodu.⁵² Inne podejście realizujące założenia „click chemistry” zostało zaproponowane przez Killopsa i współpracowników,⁵³ którzy wykorzystali reakcję rodnikowej addycji tiolu do wiązania podwójnego alkenu (*ang.* thiol-ene reaction) w celu syntezy dendronów, jak i funkcjonalizacji powierzchni otrzymywanych dendrymerów (Rysunek 13B).⁵³ Wydaje się, że metody opierające się o ideę „click chemistry” mogą być bardzo obiecujące w syntezie i funkcjonalizacji dendrymerów. Podkreślić należy, że syntezy dendrymerów z wykorzystaniem podejścia „click chemistry” przebiegają ilościowo, a powstające produkty zazwyczaj nie wymagają dodatkowego oczyszczania. Ponadto powstające produkty uboczne to z reguły nieszkodliwe gazy oraz sole nieorganiczne łatwe w oddzieleniu od pożądanego produktu.

² Z racji braku polskiego odpowiednika na określenie ‘click chemistry’, w dalszej części niniejszej rozprawy będzie ono stosowane w formie anglojęzycznej.



Rysunek 13. „Click chemistry” w syntezie dendrymerów. (A) reakcja z wykorzystaniem cykloadycji do 1,2,3-triazoli; (B) reakcja z wykorzystaniem rodnikowej addycji tiolu do wiązania podwójnego alkenu.

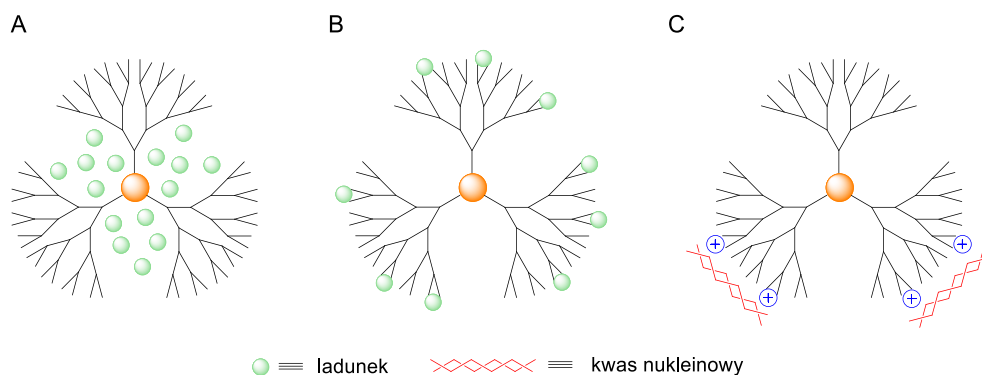
Do dnia dzisiejszego otrzymano ogromną liczbę dendrymerów o zróżnicowanej budowie, które klasyfikuje się ze względu na ich strukturę do określonych rodzin. Jednymi z najstarszych dendrymerów są pochodne aminokwasowe bazujące na lizynie.⁵⁴ Najstarszymi komercyjnie dostępnymi dendrymerami są pochodne oparte o struktury polipropylenoamin (PPI)^{55,56} oraz poliamidoaminy (PAMAM).⁵⁷ Innymi powszechnie wykorzystywanymi wariantami są pochodne eteroamin^{58,59,60,61} należące do dendrymerów kationowych stworzonych na potrzeby transportu kwasów nukleinowych. Dendrymerami o potencjalnych zastosowaniach biomedycznych są pochodne, których struktury dendronów oparte są na szkielecie: *N*-tris[[2-[[tris[[2-*tert*-butoksykarbonylo)etoksy]-metylo)metylo]amino]karbonylo)etoksy)metylo]metyloaminowym,⁶² fosforowym,^{63,64}



s-triazynowym,^{65,66,67} poliglicerolowym,⁶⁸ poliestrowym,⁶⁹ a także krzemooorganicznym.^{70,71} Ciekawym przykładem dendrymeru jest całkowicie hydrofobowa pochodna polifenilenowa zbudowana wyłącznie z pierścieni benzenowych i łańcuchów alifatycznych.⁷²

3.3.3.2. Strategie sprzęgania dendrymerów z cząsteczkami biologicznie aktywnymi

Szerokie zainteresowanie dendrymerami jako nanonośnikami doprowadziło do opracowania wielu skutecznych metod tworzenia połączeń dendrymerów z cząsteczkami, które mają być transportowane. Obecnie istnieje szereg metod tworzenia koniugatów dendrymer-cząsteczka transportowana, które można podzielić na trzy główne strategie: (i) zamykanie w strukturze dendrymeru, (ii) sprzęganie poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych oraz (iii) tworzenie kompleksów (Rysunek 14).



Rysunek 14. Główne metody tworzenia koniugatów cząsteczek ładunków z dendrymerami. (A) zamykanie wewnątrz struktury dendrymeru; (B) sprzęganie na drodze tworzenia wiązań kowalencyjnych na powierzchni dendrymeru; (C) tworzenie kompleksów na drodze oddziaływań elektrostatycznych.

Pierwsza ze wspomnianych metod polega na „pułapkowaniu” małych cząsteczek ‘ładunku’ w hydrofobowych jamach tworzonych przez rozgałęzioną strukturę dendrymeru. Metoda ta znajduje szerokie zastosowanie w zwiększaniu rozpuszczalności związków silnie hydrofobowych umożliwiając ich rozpuszczenie w rozpuszczalnikach polarnych. Możliwość wprowadzania oraz uwalniania cząsteczki ‘ładunku’ z hydrofobowych jam dendrymeru może być przy tym kontrolowana przez fizykochemiczne właściwości dendronów, wchodzących w skład dendrymeru, a także przez ilość generacji w strukturze nanonośnika (Rysunek 14A).^{45,73,74}

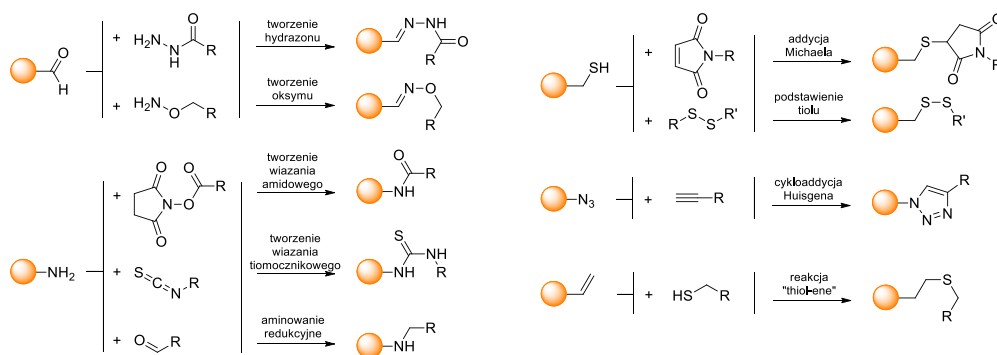
Innym podejściem w kreacji połączeń dendrymer-cząsteczka transportowana jest tworzenie kompleksów na drodze oddziaływań elektrostatycznych. Metoda ta doskonale sprawdza się przede wszystkim w stosunku do kwasów nukleinowych posiadających w swojej strukturze liczne ładunki ujemne pochodzące od reszt fosforanowych (Rysunek 14C).⁴⁵

Technikami wiodącymi prym i dającymi największą możliwość w tworzeniu koniugatów dendrymerów z cząsteczkami biologicznie czynnymi są te oparte na syntezie wiązań kowalencyjnych. Z racji konieczności tworzenia wiązań pomiędzy komponentami przyszłego koniugatu, cząsteczki ładunku najczęściej lokowane są na peryferiach

dendrymeru bogatego w reaktywne grupy funkcyjne. W przypadku tej strategii cząsteczki makromolekuł, leków czy też innych indywiduów chemicznych, mogą być przyłączane do struktury dendrymeru w różnoraki sposób, zależny od rodzaju grup funkcyjnych znajdujących się w strukturach cząsteczki ładunku oraz dendrymeru (Rysunek 14B).

Najbardziej popularne i najczęściej stosowane dendrymery lizynowe, PAMAM oraz PPI zawierają na swojej powierzchni wolne grupy aminowe, które umożliwiają wykorzystanie szerokiego wachlarza reakcji pozwalających na generowanie nowych wiązań kowalencyjnych. W takim przypadku stosowaną techniką sprzęgania jest tworzenie wiązań amidowych z estrami aktywnymi (NHS, HOBt) kwasów karboksylowych. Biorąc pod uwagę fakt, że dendrymery aminokwasowe, PAMAP i PPI są dostępne komercyjnie, a ponadto na rynku dostępne są związki biologicznie czynne w postaci estrów aktywnych, możliwe jest proste i wydajne otrzymywanie koniugatów w jednym tylko etapie polegającym na syntezie wiązań amidowych między strukturami nanonośnika i cząsteczki transportowanej.^{75,76,77,78,79}

Innymi reakcjami stosowanymi do tworzenia wiązania kowalencyjnego z udziałem grupy aminowej jest aminowanie redukcyjne, które wymaga obecności ugrupowania karbonylowego na jednym z komponentów potencjalnego koniugatu. Zastosowanie znajduje także reakcja z izotiocyanianem, dająca w rezultacie trwałe wiązanie tiomocznikowe (Rysunek 15).⁸⁰



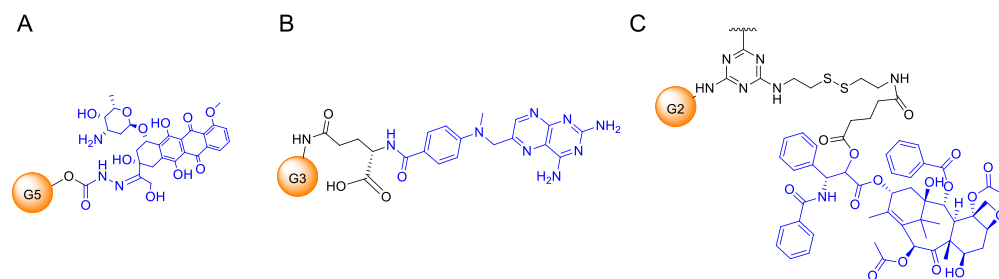
Rysunek 15. Strategie sprzęgania cząsteczek biologicznie aktywnych ze strukturą dendrymeru w zależności od grup funkcyjnych obecnych na powierzchni nanonośnika.

Dendrymery posiadające na swej powierzchni ugrupowania karbonylowe – aldehydy i ketony – mogą być łatwo sprzęgane z cząsteczkami ‘ładunków’ na drodze reakcji prowadzących do utraty tlenu karbonylowego, takich jak tworzenie imin, hydrazonów czy oksymów. Ponadto zastosowanie takiego podejścia syntetycznego umożliwi późniejsze odszczepienie cząsteczki ładunku, będące wynikiem zmiany odczynu pH, ponieważ wspomniane pochodne związków karbonylowych w niskim pH ulegają lizie do wyjściowych substratów (Rysunek 15).^{81,82,83}

Szczególną rolę w tworzeniu koniugatów z dendrymerami odgrywają reakcje przebiegające z udziałem atomu siarki. Nanonośniki posiadające na swoich peryferiach grupy tiolowe mogą ulegać reakcji addycji Michaela do α,β -nienasyconych układów karbonylowych; ponadto wchodzi w reakcje wymiany z niesymetrycznymi disulfidami (Rysunek 15).^{76,77,84}

Strategia „click chemistry” oferuje interesujące podejście do problematyki sprzęgania cząsteczek o różnej strukturze z dendrymerami. Za dobry przykład może posłużyć reakcja cykloaddycji Huisgena azydów z alkinami Cu^I-katalizowana prowadząca do układu triazynowego.^{85,84} Innym podejściem jest wspomniana już wcześniej reakcja typu „thiol-ene” dająca jako produkt sulfid, którego wiązanie S-C generowane jest z cząsteczki tiolu i alkeny (Rysunek 15).^{53,85,86,87}

Dendrymery ze względu na swoją różnorodność i praktycznie nieograniczoną możliwość modyfikacji w warstwie peryferyjnej cieszą się niebywale wielkim zainteresowaniem naukowców podejmujących problematykę transportu przez błonę biologiczną. Zaowocowało to otrzymaniem ogromnej liczby pochodnych z różnorodnymi substancjami aktywnymi o bardzo zróżnicowanych celach molekularnych. Szczególnie dużym zainteresowaniem w przypadku dendrymerów cieszy się transport małych cząsteczek. Wśród nich warte wspomnienia są: niesteroidowe leki przeciwzapalne,^{88,89,90,91,92,93,94,95,96} przeciwnowotworowe,^{97,98,99,100} przeciwmalaryczne,^{101,102} przeciwgrybicze,^{89,103} przeciwbakteryjne,^{104,105,106} przeciwwrzdowe,⁸⁹ kortykosteroidy,^{107,108} przeciwwirusowe,^{109,110} antydepresanty¹¹¹ i wiele innych. Podobnie jak w przypadku nanorurek, dendrymery cieszą się niezwykłym powodzeniem w transporcie leków przeciwnowotworowych (Rysunek 16 i Tabela 2).



Rysunek 16. Przykłady połączeń dendrymerów z lekami przeciwnowotworowymi. (A) Koniugat z doksorubicyną – połączenie za pomocą reszty hydrazonu; (B) koniugat z metotreksatem – połączenie za pomocą wiązania amidowego; (C) koniugat z paklitaksellem – połączenie za pomocą wiązania disulfidowego.

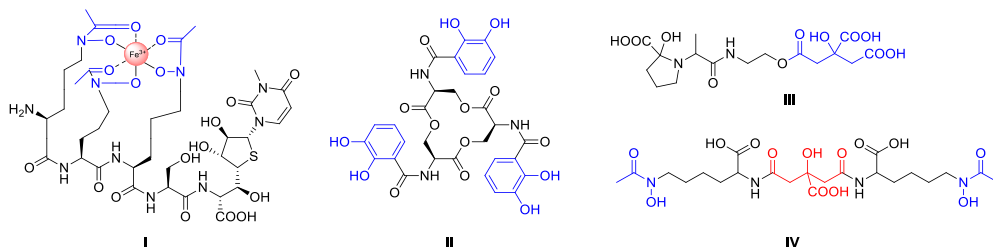
Tabela 2. Przykłady zastosowania dendrymerów w transporcie substancji przeciwnowotworowych.

Cząsteczka aktywna	Rodzaj dendrymeru, rodzaj połączenia	Badania biologiczne	Lit.
Doksorubicyna	Poli(tlenek etylenu), hydrazon	<i>In vitro, in vivo</i> , nowotwór piersi	112
	PEG-Poliester, hydrazon	<i>In vitro, in vivo</i> , nowotwór okrężnicy	113
	PEG-Polilizyna, hydrazon	<i>In vivo</i> , nowotwór piersi	81
	PEG-PAMAM, amid <i>cis</i> -akonitowy	<i>In vitro</i> , nowotwór jajnika	114
Metotreksat	PAMAM, enkapsulacja	<i>In vitro</i> , nowotwór wątroby	115
	PAMAM, amid	<i>In vitro</i> , białaczka	116
	PAMAM, tiomocznik	<i>In vitro</i> , brodawczak	117
Paklitaksel	Triazynowy, kompleks	<i>In vivo</i> , myszy, redukcja hepatotoksyczności	118
	Triazynowy, disulfid	<i>In vitro</i> , nowotwór gruczołowy	119



3.3.4. Siderofory

Siderofory to związki o stosunkowo niskich masach cząsteczkowych, wykazujące silną tendencję do chelatowania jonów żelaza(III). W przyrodzie siderofory produkowane są na ogół przez patogenne drobnoustroje i wydzielane do środowiska zewnętrznego w warunkach ograniczonego dostępu jonów żelaza, na przykład podczas inwazji do ssaczych komórek gospodarza. Wydzielane przez mikroorganizmy siderofory wykazują silne powinowactwo do jonów Fe^{3+} , tym samym mogą tworzyć kompleksy z jonami żelaza obecnymi w białkach komórek gospodarza. Tworzone przez siderofory chelaty są następnie transportowane z powrotem do komórek patogennych mikroorganizmów, gdzie na skutek aktywności reduktaz dochodzi do redukcji jonów Fe^{3+} do Fe^{2+} i rozpadu kompleksu. W konsekwencji zapewniają komórkom patogennym źródło żelaza niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania i wzrostu. Do dnia dzisiejszego zostało scharakteryzowanych ponad 500 naturalnie występujących sideroforów, głównie pochodnych katecholi, kwasów hydroksamowych oraz kwasów α -hydroksykarboksylowych – szczególnie kwasu cytrynowego (Rysunek 17).^{120,121,122,10}



Rysunek 17. Przykłady naturalnie występujących sideroforów pochodnych: kwasów hydroksamowych I, katecholi II, kwasu cytrynowego III oraz kwasów cytrynowego i hydroksamowego IV.

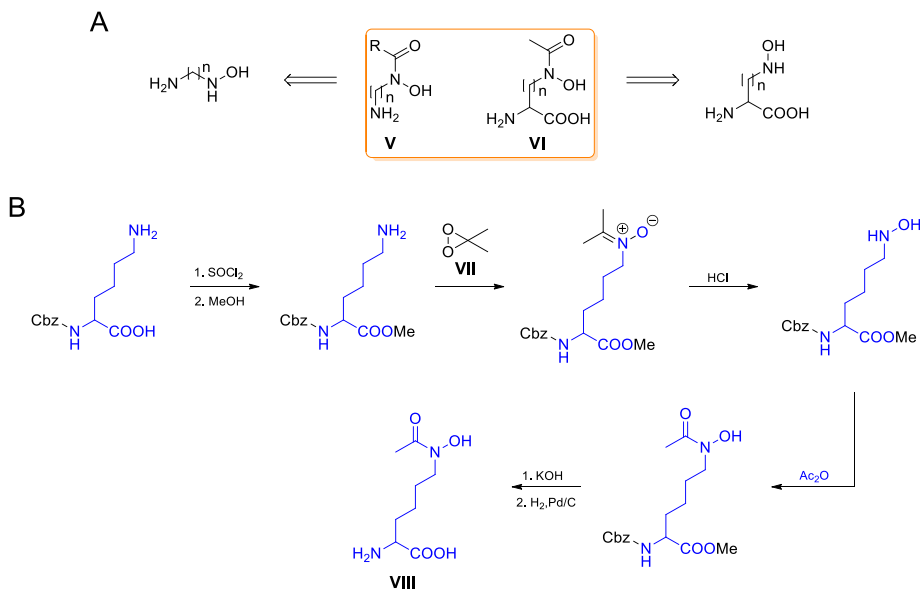
3.3.4.1. Synteza wybranych sideroforów naturalnych

Badania nad budową chemiczną naturalnie występujących sideroforów wykazały, że związki te mają raczej proste struktury, zbudowane z rdzenia i połączonych z nim kleszczowych ligandów zdolnych do chelatowania jonów żelaza(III). Ligandy większości sideroforów są pochodnymi kwasów karboksylowych, hydroksamowych oraz katecholi. Synteza chemiczna naturalnie występujących sideroforów opiera się więc głównie na opracowaniu wydajnych metod otrzymywania wymienionych wcześniej układów. Siderofory katecholowe są zazwyczaj otrzymywane z pochodnych dihydroksybenzoilowych oraz pochodnych dihydroksyfenyloalaniny. W celu otrzymywania sideroforów α -hydroksykarboksylowych najczęściej stosuje się kwas cytrynowy, a siderofory hydroksamowe w większości przypadków bazują na strukturach ligandów V i VI, otrzymywanych odpowiednio z 1-amino- ω -(*N*-hydroksyamino)alkanów i ω -*N*-hydroksyaminokwasów (Rysunek 18A).¹²³

Synteza chemiczna sideroforów hydroksamowych wzorowana jest najczęściej na biosyntezie tych związków, polegającej na bezpośrednim utlenianiu amin do hydroksyloamin i późniejszym ich selektywnym *N*-acylowaniu do pochodnej kwasu hydroksamowego. Wyzwaniem staje się otrzymanie pochodnych hydroksyloamin z dobrą



wydajnością i w możliwie jak najmniejszej liczbie etapów. Szeroko stosowanym związkiem utleniającym ugrupowania aminowe do *N*-hydroksyloaminowych, dającym zadowalające rezultaty w syntezie chemicznej sideroforów, jest dimetylodioksiran (DMD) **VII**. Odczynnik ten przekształca w jednoetapowym procesie utlenienia grupy aminowe do pożądanej pochodnej. Na Rysunku 18B przedstawiono drogę syntezy części hydroksamowej **VIII** sideroforów z zastosowaniem DMD jako czynnika utleniającego.^{123,124,125}



Rysunek 18. (A) Struktury najczęściej stosowanych sideroforowych ligandów hydroksamowych **V** i **VI**; (B) Droga syntezy układu hydroksamowego z zastosowaniem DMD jako czynnika utleniającego.

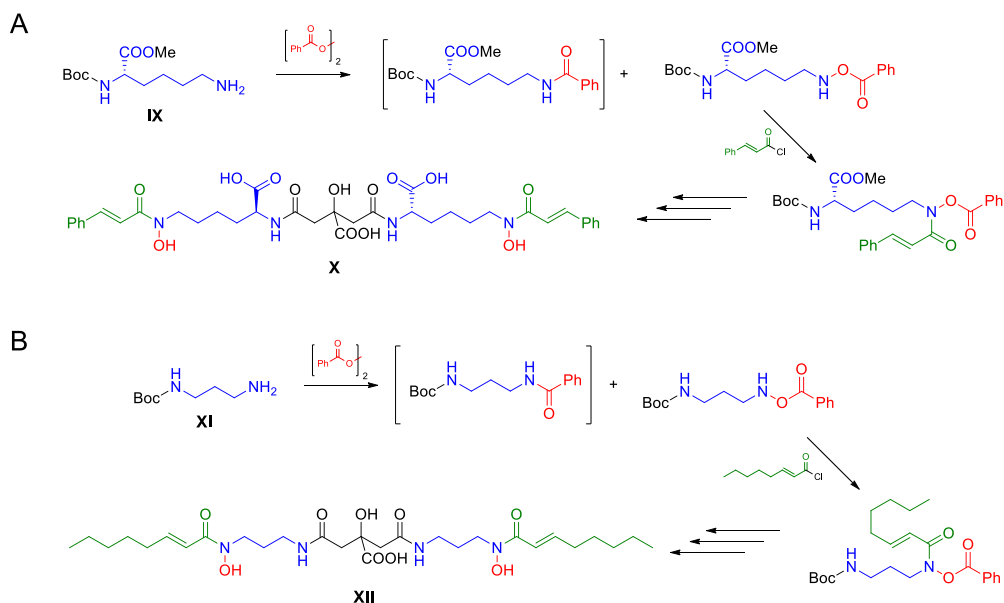
Badania prowadzone nad optymalizacją otrzymywania ligandów sideroforowych, doprowadziły do opracowania metod syntezy totalnej niektórych naturalnych sideroforów. Bergeron i współpracownicy¹²⁶ przeprowadzili totalną syntezę sideroforu nanocheliny **A X** (Rysunek 19A). Siderofor ten, będący pochodną kwasu cytrynowego, posiada w swojej strukturze hydroksamowe ugrupowanie kwasu cynamonowego. Bergeron otrzymał ten związek stosując jako wyjściowy substrat ester metylowy *N*²-Boc-L-lizyny **IX**. Ester ten został poddany selektywnemu utlenieniu wolnej grupy ω-aminowej nadtlaniem benzoilu. Jeden z otrzymanych produktów, pochodną *O*-benzoilohydroksyloaminy po *N*-acylowaniu chlorkiem kwasu cynamonowego, usunięciu grup ochronnych i kondensacji z pochodną kwasu cytrynowego, przekształcono w naturalny siderofor – nanochelinę **A X** (Rysunek 19A).¹²⁶

Innym przykładem syntezy totalnej sideroforu naturalnego, opartym o zastosowanie nadtlenu benzoilu jako czynnika utleniającego, jest zaproponowana przez Okujo i współpracowników¹²⁷ metoda otrzymywania acinetoferriny **XII**, zawierającej w swojej strukturze reszty kwasów cytrynowego oraz hydroksamowego. Metoda ta polega na utlenieniu pierwszorzędowej grupy aminowej Boc-chronionej diaminy **XI** do pochodnej hydroksyloaminowej za pomocą nadtlenu benzoilu i późniejszym jej *N*-acylowaniu chlorkiem kwasu *E*-2-oktenowego, aby w końcowym etapie przeprowadzić sprzężenie tak



powstałego kwasu hydroksamowego z odpowiednio aktywowaną pochodną kwasu cytrynowego.¹²⁷

Syntezy przeprowadzone, zarówno przez Bergenona,¹²⁶ jak i Okujo¹²⁷ pokazują możliwość zastosowania nadtlenu benzoilu jako czynnika utleniającego aminy do pochodnych hydroksyloaminowych, przy jednoczesnym wykorzystaniu powstającego ugrupowania *O*-benzoilowo jako grupy ochronnej podczas reakcji N-acylowania hydroksyloaminy (Rysunek 19).^{126,127}



Rysunek 19. Uproszczony schemat totalnej syntezy sideroforu: (A) nannocheliny A oraz (B) acinetoferriny.

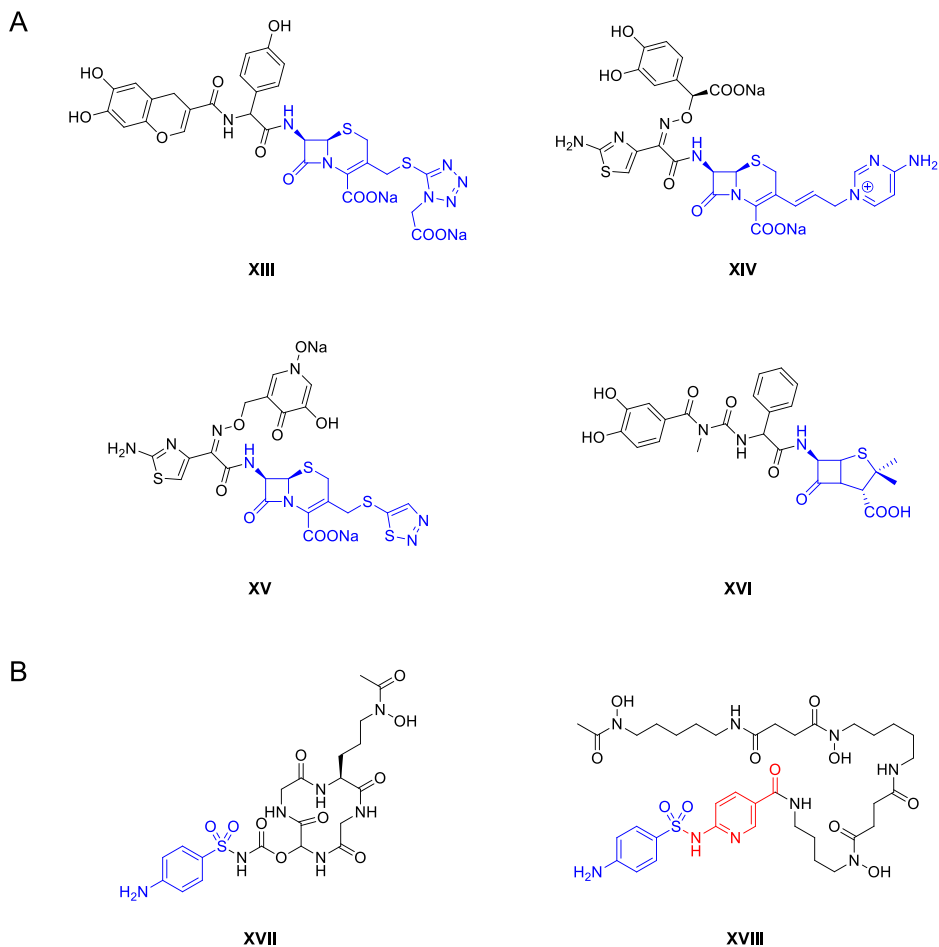
Oprócz syntezy totalnej naturalnie występujących sideroforów, wiele grup badawczych podejmuje prace związane z poszukiwaniem i syntezą nowych związków o charakterze sideroforów oraz modyfikacjami chemicznymi wcześniej opisanych pochodnych.^{128,129,130,131,132,133,134}

3.3.4.2. Połączenia sideroforów z cząsteczkami aktywnymi biologicznie

Zastosowanie sideroforów jako nośników substancji aktywnych do komórek patogennych mikroorganizmów, opiera się na założeniu, że możliwe jest wykorzystanie do tego celu naturalnego systemu transportu jonów żelaza danego patogenu. Transport ten odbywa się przy udziale zmodyfikowanych sideroforów, zawierających w swojej strukturze kowalencyjnie przyłączoną cząsteczkę substancji aktywnej. Połączenie takie na ogół składa się z trzech zasadniczych komponentów: (i) sideroforu – odpowiedzialnego za chelatowanie jonów Fe^{3+} i transport w poprzek błony komórkowej, (ii) łącznika odpowiedzialnego za przyłączenie cząsteczki aktywnej do struktury sideroforu oraz (iii) cząsteczki aktywnej o określonych właściwościach biologicznych. Kluczowym elementem takiego układu transportującego jest sposób połączenia cząsteczki leku z sideroforem. W większości przypadków struktura łącznika jest integralną częścią konstytucji cząsteczki aktywnej oraz



sideroforu i może nią być na przykład wiązanie amidowe, utworzone pomiędzy grupą karboksylową cząsteczki transportowanej i aminową sideroforu, rozpoznawane i hydrolizowane przez komórkowe amidazy.¹²³ Dobrym przykładem takich właśnie połączeń są koniugaty sideroforów z antybiotykami β -laktamowymi, w których grupa aminowa układu laktamowego tworzy labilne wiązanie amidowe z grupą karboksylową nośnika (Rysunek 20A).^{135,136,137,138}



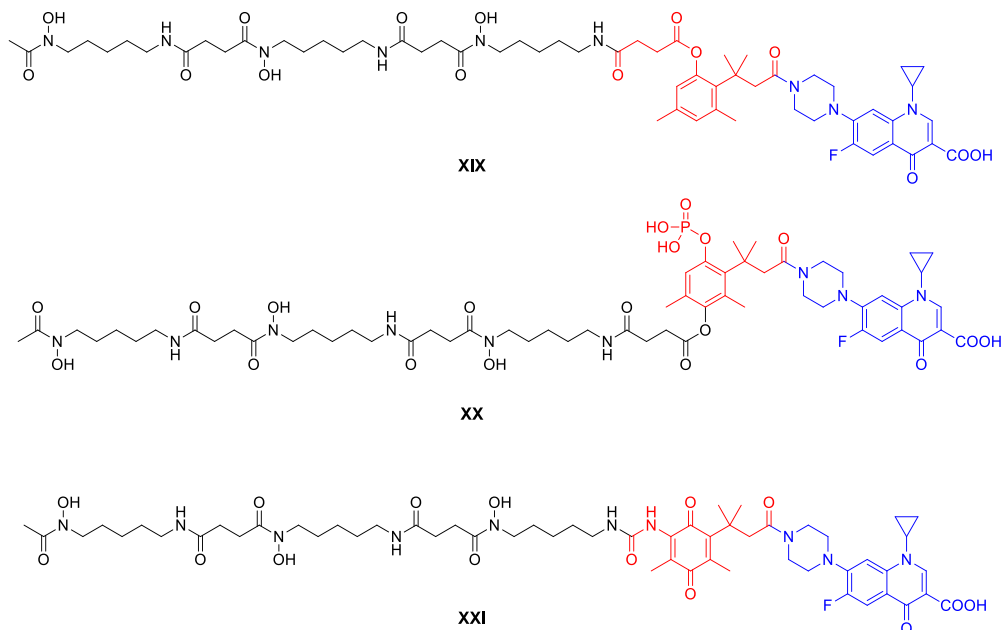
Rysunek 20. (A) Przykłady połączeń sideroforów katecholowych z układami β -laktamowymi; (B) połączenia sulfonamidów z sideroforami hydroksamowymi.

Bardziej zaawansowanym podejściem do problematyki łączenia cząsteczki ‘ładunku’ z sideroforem jest wykorzystanie łączników stanowiących odrębne indywidua pośredniczące między strukturami nośnika i cząsteczki transportowanej. O tym jak ważny jest dobór odpowiedniego łącznika, świadczą wyniki badań przeprowadzonych przez Zahnera i Diddensa,¹³⁹ którzy otrzymali serię pochodnych hydroksamowych sideroforów w połączeniu z sulfonamidami. Wyniki badań pokazały, że pochodne **XVII** połączone za pomocą wiązania sulfonamidowego praktycznie nie wykazywały aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Natomiast zastosowanie pochodnej kwasu nikotynowego jako



łącznika, w innej serii pochodnych, dało zadowalające wyniki, dowodzące aktywności biologicznej otrzymanych połączeń **XVIII** (Rysunek 20B).¹³⁹

Miller i współpracownicy^{140,141} zaproponowali zastosowanie układów zwanych 'trimethyl lock', labilnych w środowisku aktywności esteraz, fosfataz oraz reduktaz komórkowych, jako łączników pośredniczących między strukturą sideroforu hydroksamowego a cząsteczką cyprofloksacyny (Rysunek 21).



Rysunek 21. Połączenia sideroforów hydroksamowych z cyprofloksacyną z wykorzystaniem łączników typu 'trimethyl lock', labilnych w środowisku: esteraz **XIX**, fosfataz **XX** i reduktaz **XXI**.

We wszystkich trzech podejściach syntetycznych prowadzących do otrzymania pożądanych koniugatów, cząsteczka cyprofloksacyny została połączona z łącznikiem za pomocą wiązania amidowego pomiędzy grupami: karboksylową łącznika oraz aminową cząsteczki transportowanej. Zasadnicza różnica w stosowaniu opisywanych łączników polegała w sposobie przyłączenia cząsteczki sideroforu. W przypadku łącznika wrażliwego na działanie komórkowych esteraz **XIX**, fenolowa grupa hydroksylowa łącznika jest połączona z grupą karboksylową sideroforu, co uniemożliwia proces laktonizacji i uwolnienie cząsteczki biologicznie aktywnej. W środowisku cytoplazmy wiązanie to jest hydrolizowane, a cząsteczka leku zostaje uwolniona na drodze wewnątrzcząsteczkowej reakcji estryfikacji. Zastosowanie łącznika **XX** hydrolizowanego przez komórkowe fosfatazy wymaga nieco innego podejścia. W tym przypadku cząsteczka sideroforu nie acyluje hydroksylowej grupy odpowiedzialnej za proces cyklizacji, a ugrupowanie hydroksylowe znajdujące się do niej w orientacji *para*. Grupa hydroksylowa wyzwalająca proces laktonizacji jest w tym przypadku zestryfikowana resztą kwasu fosforowego(V), które to wiązanie ulega lizie katalizowanej przez fosfatazy co prowadzi do odblokowania grupy hydroksylowej i cyklizacji układu połączonego z uwolnieniem cząsteczki cyprofloksacyny. W przypadku zastosowania łącznika labilnego w środowisku aktywności reduktaz **XXI**, siderofor jest przyłączony do



łącznika za pośrednictwem wiązania typu mocznikowego. Układ benzochinonu obecny w omawianym łączniku typu „trimetyl lock” ulega we wnętrzu komórek patogenu redukcji do fenolu, który może ulegać procesowi laktonizacji, tak jak ma to miejsce we wcześniej wspomnianych układach.^{140,141}

3.3.5. Peptydy penetrujące

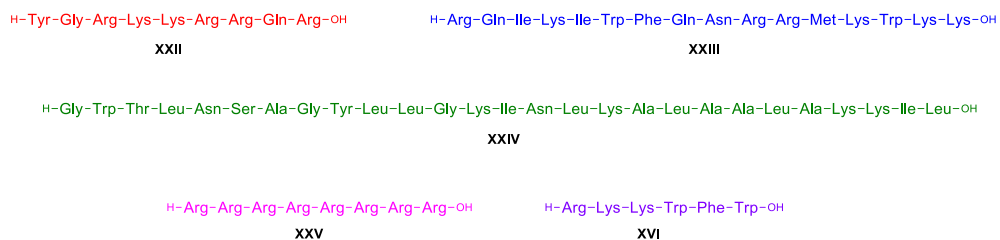
W znakomitej większości przypadków błony biologiczne są nieprzepuszczalne dla peptydów, które w roztworach wodnych mają charakter silnie polarnych jonów obojnych. Jednakże niektóre peptydy o specyficznej sekwencji aminokwasowej są zdolne do przekraczania biwarstwy lipidowej na drodze transportu biernego lub endocytozy. Peptydy takie zwyczajowo nazywa się peptydami penetrującymi. Ponadto w komórkach mikroorganizmów obecne są specjalne białka – permeazy peptydowe o szerokim spektrum specyficzności substratowej, których aktywność polega na transportowaniu krótkich (2-8 reszt aminokwasowych) peptydów przez błonę komórkową, przy czym transport ten odbywa się wbrew gradientowi stężenia peptydu. Wspomniane obserwacje doprowadziły do wniosku, że peptydy penetrujące oraz ich analogi mogą posłużyć jako transportery substancji aktywnych do komórek patogennych mikroorganizmów.¹⁰

Jedną z głównych strategii postępowania, prowadzących do translokacji małych polarnych cząsteczek substancji aktywnych do wnętrza patogennych komórek, jest ich sprzężenie z peptydem penetrującym, który po przetransportowaniu przez błonę biologiczną uwalnia cząsteczkę ładunku na drodze lizy enzymatycznej. Peptydy takie zbudowane są zazwyczaj z 6-30 reszt aminokwasowych i zdolne są do przenikania przez błonę biologiczną, nie powodując przy tym jej uszkodzenia. Pierwsze naturalne peptydy penetrujące zostały zidentyfikowane na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych dwudziestego wieku i były to duże peptydy zawierające 86 (białko Tat) czy 60 (pAntp) reszt aminokwasowych.¹⁴² Późniejsze badania ukierunkowane na poszukiwanie krótszej sekwencji białka Tat, odpowiedzialnej za zdolność do penetracji w poprzek błony ujawniły sekwencję nonapeptydu **XXII**,¹⁴³ a analogiczne badania nad strukturą pAntp doprowadziły do identyfikacji szesnastoaminokwasowej sekwencji penetratyny **XXIII**.¹⁴⁴ Późniejsze badania doprowadziły do opracowania szeregu syntetycznych i półsyntetycznych peptydów penetrujących, takich jak: transportan **XXIV** (27 reszt aminokwasowych), najbardziej popularną wśród peptydów penetrujących oktaargininę **XXV** oraz najkrótszy peptyd o omawianych właściwościach PAF-26 **XXVI** (Rysunek 22).^{145,146}

Jednym z najczęściej spotykanych kryteriów podziału peptydów penetrujących jest ich struktura chemiczna. Wyróżnić możemy cztery podstawowe grupy: (i) peptydy oligokationowe, (ii) amfipatyczne, (iii) bogate w reszty proliny oraz (iv) hydrofobowe.¹⁴⁷

Peptydy **oligokationowe** charakteryzują się przede wszystkim wysokim udziałem w sekwencji reszt lizyny i argininy przy niemal całkowitym braku reszt aminokwasów o charakterze kwasowym, co nadaje całej strukturze peptydu silny, wypadkowy ładunek dodatni. Przykładami peptydów penetrujących należących do tej grupy są między innymi nonaaminokwasowy łańcuch białka Tat **XXII** oraz oktaarginina **XXV**.¹⁴⁸





Rysunek 22. Sekwencje aminokwasowe peptydów penetrujących: nonapeptydu białka Tat **XXII**, penetratyny **XXIII**, transportanu **XXIV**, oktaargininy **XXV** i PAF-26 **XXVI**.

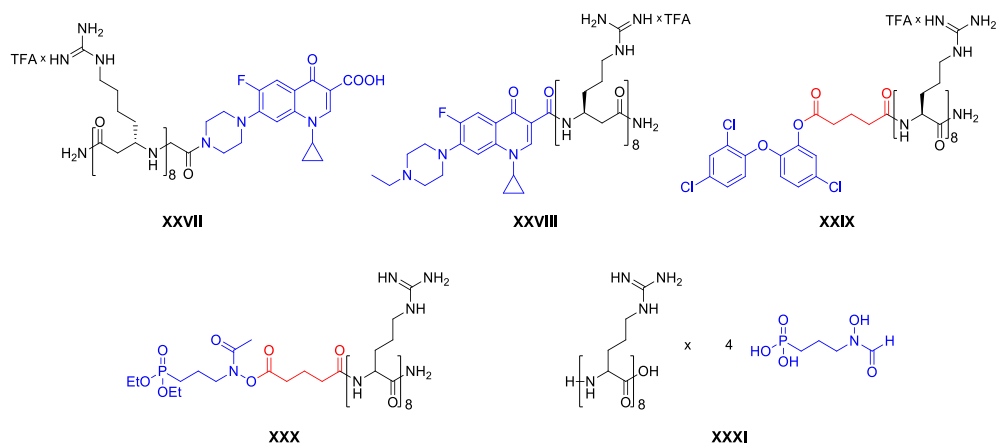
Cechą charakterystyczną **amfipatycznych** peptydów penetrujących jest duża częstość występowania reszt argininy oraz lizyny, a także aminokwasów o hydrofobowych łańcuchach bocznych – głównie tryptofanu i fenyloalaniny. W przypadku tej grupy peptydów ich amfipatyczność wynika z podziału sekwencji aminokwasowej na część hydrofilową, bogatą w sprotonowane reszty lizyny i argininy oraz hydrofobową – tworzoną przez łańcuchy boczne tryptofanu i fenyloalaniny. Amfipatyczność może być także uwarunkowana strukturą drugorzędową peptydu, gdzie reszty lizyny i argininy w postaci kationów rozlokowane są po przeciwnej stronie struktury drugorzędowej w stosunku do reszt hydrofobowych. Przykładem peptydu penetrującego należącego do grupy amfipatycznej jest heksapeptyd PAF-26 **XVI**.¹⁴⁹

Cechą charakterystyczną niektórych peptydów penetrujących jest bardzo duży udział reszt proliny w sekwencji aminokwasowej. Niektóre peptydy penetrujące **bogate w reszty proliny** można zakwalifikować do peptydów amfipatycznych, ze względu na tworzoną helikalną strukturę drugorzędową, dzielącą całą cząsteczkę peptydu na część hydrofilową i hydrofobową. Peptydami penetrującymi bogatymi w reszty proliny są na przykład γ -zeina, w sekwencji której 9 na 18 aminokwasów stanowią reszty proliny.¹⁴⁹

Hydrofobowe peptydy penetrujące stanowią stosunkową niewielką grupę pochodnych, w porównaniu do wcześniej omawianych. Przedstawiciele tej grupy charakteryzują się brakiem lub bardzo niskim wypadkowym ładunkiem. Peptydy hydrofobowe zbudowane są wyłącznie z aminokwasów o lipofilowych łańcuchach bocznych lub mogą posiadać w swej sekwencji tylko nieliczne reszty zjonizowane. Przedstawicielem tej grupy peptydów penetrujących jest między innymi piętnaściamiokwasowa sekwencja fragmentu domeny sygnałowej czynnika wzrostu fibroblastów Kaposiego (K-FGF), składająca się wyłącznie z reszt alaniny, waliny, leucyny i proliny.^{150,151}

Z racji zdolności peptydów penetrujących do przenikania w poprzek błony lipidowej, znalazły one zastosowanie jako transportery substancji czynnych biologicznie do wnętrza komórek. Pod względem chemicznym tworzenie połączenia peptydu penetrującego z cząsteczką aktywną jest najczęściej realizowane za pośrednictwem wiązań amidowych lub estrowych. W przypadku tworzenia wiązań amidowych cząsteczką transportowaną może zostać zlokalizowana zarówno na C- jak i N-końcu sekwencji peptydu, a także może zostać wbudowana w sekwencję aminokwasową o ile wykazuje charakter aminokwasowy. Ponadto obecność w sekwencji aminokwasowej peptydu łańcuchów bocznych cysteiny daje możliwość tworzenia układów disulfidowych, wrażliwych na redukcyjną aktywność glutationu.¹⁵²

Innym podejściem do tworzenia połączeń peptydów penetrujących z cząsteczkami transportowanymi jest zastosowanie swoistych „zaczepów jonowych” pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami guanidyny reszt bocznych argininy a ujemnie zjonizowanymi ugrupowaniami, takimi jak reszty fosforanowe, sulfonowe oraz karboksylowe związku przyłączanego. Dane literaturowe zawierają doniesienia o zastosowaniu peptydów penetrujących w transporcie takich molekuł jak białka,¹⁵³ oligopeptydy,¹⁵⁴ siRNA,^{155,156} kwasy peptydonukleinowe¹⁵⁷ oraz oligonukleotydy.¹⁵⁸ Na Rysunku 23 przedstawiono różne warianty połączeń cząsteczki transportowanej z oktaargininą.^{159,160}



Rysunek 23. Różne sposoby połączenia cząsteczek substancji aktywnych z oktaargininą. Połączenie za pośrednictwem wiązania amidowego od strony: C-końca **XXVII**; N-końca **XXVIII**; N-końca z zastosowaniem łącznika glutarowego **XXIX** i **XXX**; połączenie za pośrednictwem „zaczepu jonowego” **XXXI**.

3.3.6. Parasole molekularne

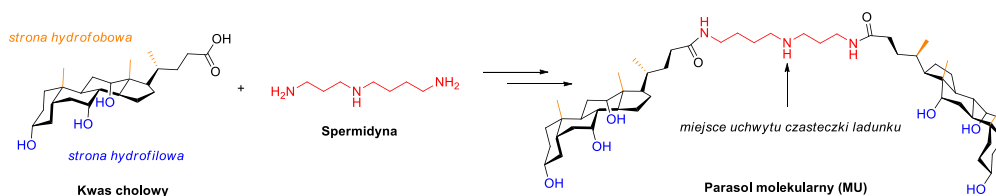
3.3.6.1. Idea transportu z wykorzystaniem parasoli molekularnych

W drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych XX wieku na łamach *Journal of American Chemical Society*, Regen i współpracownicy¹⁶¹ przedstawili ideę nowego środka powierzchniowo czynnego o potencjalnym zastosowaniu w transporcie w poprzek błony komórkowej – tzw. parasola molekularnego (*ang.* **Molecular Umbrella**, MU). Idea MU opiera się o wykorzystanie co najmniej dwóch indywidualnych chemicznych o właściwościach amfifilowych – posiadających dwie strony o wyraźnych właściwościach hydrofilowych oraz hydrofobowych – połączonych ze sobą w określony sposób. Tworząc konstytucję MU, Regen¹⁶¹ wykorzystał jako indywidualium amfifilowe jeden z naturalnie występujących kwasów żółciowych – kwas cholowy oraz także naturalnie występującą poliaminę alifatyczną – spermidynę jako spoiwo pośredniczące między resztami kwasu cholowego (Rysunek 24).^{161,162}

Przedstawiony na Rysunku 24 najprostszy wariant parasola molekularnego, posiada w swojej strukturze wolną drugorzędową grupę aminową, która może służyć jako miejsce przyłączania cząsteczek aktywnych biologicznie, tworząc tym samym koniugat nanoonośnika z substancją aktywną. Struktura chemiczna cząsteczki parasola molekularnego, umożliwiającą dużą swobodę zmian konformacyjnych oraz wyraźny charakter amfifilowy,

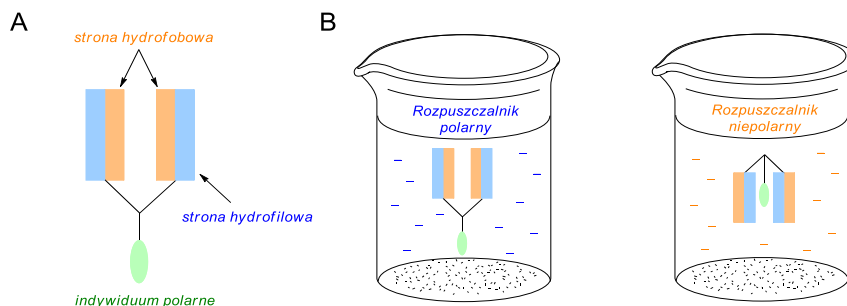


nadają połączeniom MU–cząsteczka transportowana interesujące właściwości. Parasole molekularne wykazują zdolność do maskowania hydrofilowego lub hydrofobowego charakteru cząsteczek z nimi połączonych, na skutek zmian konformacyjnych zależnych od stopnia polarności środowiska w jakim znajduje się koniugat. W środowisku polarnym zmiany konformacyjne struktury MU prowadzą do eksponowania polarnych grup hydroksylowych do środowiska zewnętrznego, tym samym niepolarne ugrupowania węglowodorowe oddziałują ze sobą. Dokładnie odwrotna sytuacja ma miejsce w rozpuszczalnikach o silnych właściwościach lipofilowych. Na Rysunku 25 przedstawiono zachowanie się koniugatu parasola molekularnego z polarną cząsteczką ‘ładunku’ w środowiskach o różnym stopniu polarności.^{161,162}



Rysunek 24. Struktura chemiczna najprostszego parasola molekularnego.

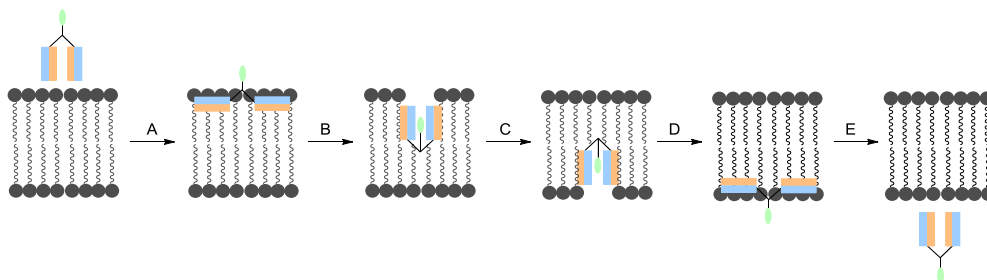
Badania fluorescencyjne potwierdzają zdolność przenikania MU do wnętrza żywych komórek ssaczy. Dowodzą tego między innymi badania Ge i współpracowników¹⁶³ przeprowadzone na komórkach HeLa z zastosowaniem koniugatów parasoli molekularnych o strukturze przedstawionej na Rysunku 24 niosących ładunek w postaci czynnika fluorescencyjnego – fluoresceiny.¹⁶³



Rysunek 25. (A) Schematyczna reprezentacja połączenia parasola molekularnego z polarną cząsteczką ładunku. (B) zachowanie się koniugatu w rozpuszczalnikach o różnym stopniu polarności.

Zaproponowany został także prawdopodobny mechanizm transportu cząsteczki polarnej przez MU zawierający dwie cząsteczki kwasu cholowego. W pierwszym etapie cząsteczka MU zbliża się w środowisku wodnym do zewnętrznej strony biwarstwy lipidowej w konformacji eksponującej ugrupowania polarne do środowiska zewnętrznego. Następnie na skutek oddziaływań hydrofobowych dochodzi do częściowej absorpcji ugrupowań steroidowych. Na tym etapie steroidowe ugrupowania hydrofilowe oddziałują z polarnymi głowami fosfolipidów błony, z kolei obszary hydrofobowe kontaktują się z resztami węglowodorowymi fosfolipidów. W kolejnym etapie następuje zmiana konformacji MU, na skutek której polarne strony kwasu żółciowego kontaktują się ze sobą, osłaniając polarną

cząsteczkę stanowiącą 'ładunek'. Jednocześnie, strony hydrofobowe oddziałują z resztami węglowodorowymi składników budulcowych błony, w wyniku czego parasol swobodnie przemieszcza się w poprzek biwarstwy lipidowej na wewnętrzną warstwę błony, gdzie dochodzi do podobnych zjawisk jak na warstwie zewnętrznej, ale w odwrotnej kolejności. Ostatecznie układ transportujący zostaje uwolniony w postaci eksponującej polarne ugrupowania do wodnego środowiska komórki (Rysunek 26).^{162,164}



Rysunek 26. Schemat potencjalnego mechanizmu transportu polarnej cząsteczki w poprzek błony lipidowej z wykorzystaniem MU jako nanoosi. (A) Absorpcja do zewnętrznej warstwy błony, (B) zmiana konformacji i przejście do niepolarnego wnętrza błony, (C) dyfuzja w poprzek błony, (D) zamiana konformacji i absorpcja do wewnętrznej warstwy błony, (E) uwolnienie koniugatu do środowiska komórki.

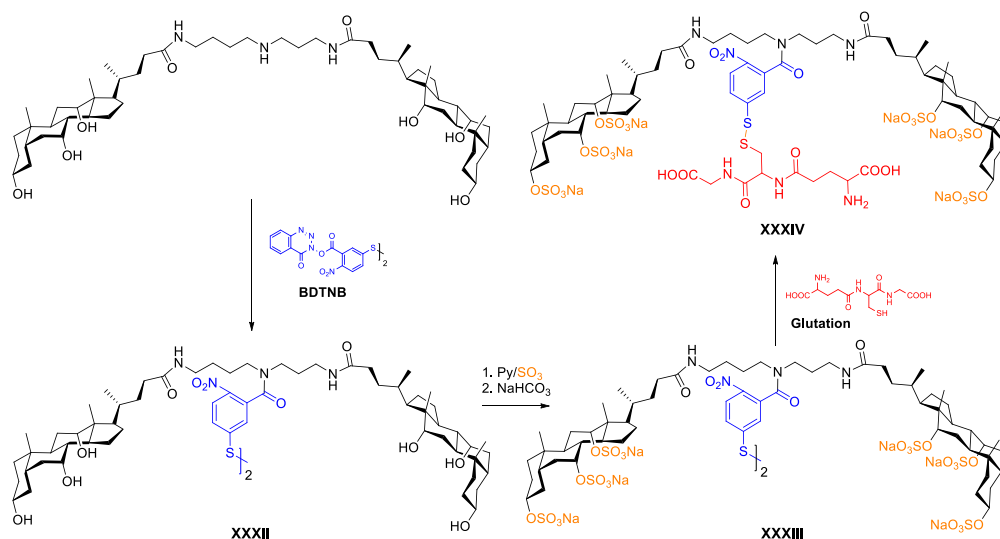
3.3.6.2. Synteza połączeń parasoli molekularnych z cząsteczkami transportowanymi

Droga syntezy parasoli molekularnych jest silnie uzależniona od rodzaju cząsteczki łącznika pośredniczącego między strukturą MU a substancją transportowaną. Dotychczasowe podejścia syntetyczne realizowane w oparciu o struktury parasoli molekularnych zostaną omówione na przykładach otrzymanych już połączeń.

Pierwsze zastosowanie parasoli molekularnych w transporcie substancji aktywnych zrealizowane zostało przy zastosowaniu łącznika **5-tiolo-2-nitrobenzoesowego**, gdzie cząsteczką transportowaną był naturalnie występujący tripeptyd – glutation. Regen i współpracownicy¹⁶⁵ przeprowadzili syntezę koniugatu wykorzystując jako substraty wyjściowe kwas cholowy oraz spermidynę. Tworzenie koniugatu polegało na syntezie struktury parasola, następującym po niej utworzeniu łącznika pośredniczącego między parasolem i cząsteczką transportowaną, a na końcu przyłączeniu glutationu. Parasol molekularny otrzymano na drodze tworzenia wiązania amidowego pomiędzy grupami: karboksylowymi kwasu cholowego i pierwszorzędowymi aminowymi spermidyny. Wiązanie amidowe zostało utworzone z wykorzystaniem metody estrów aktywnych NHS-DCC (Rysunek 24). Otrzymany MU został następnie poddany reakcji kondensacji z estrem aktywnym TDBTU układu BDTNB, produktem której była pochodna dimeryczna **XXXII** mająca w swojej strukturze wiązanie disulfidowe biorące udział w późniejszej reakcji sprzęgania z cząsteczką glutationu. Otrzymany dimer **XXXII** został poddany reakcji estryfikacji z wykorzystaniem kompleksu tritlenku siarki i pirydyny. Następnie siarczan **XXXIII** użyto jako substrat w reakcji sprzęgania z glutationem w reakcji substytucji w układzie disulfidowym, co prowadziło do utworzenia końcowego koniugatu w postaci niesymetrycznego disulfidu **XXXIV** (Rysunek 27). Janout i współpracownicy¹⁶⁶ udowodnili, że związek **XXXIV** charakteryzuje się zdolnością do przenikania przez liposomalną biwarstwę



lipidową i do uwalniania cząsteczki transportowanej na skutek aktywności glutationu zlokalizowanego w świetle liposomów.^{165,166}

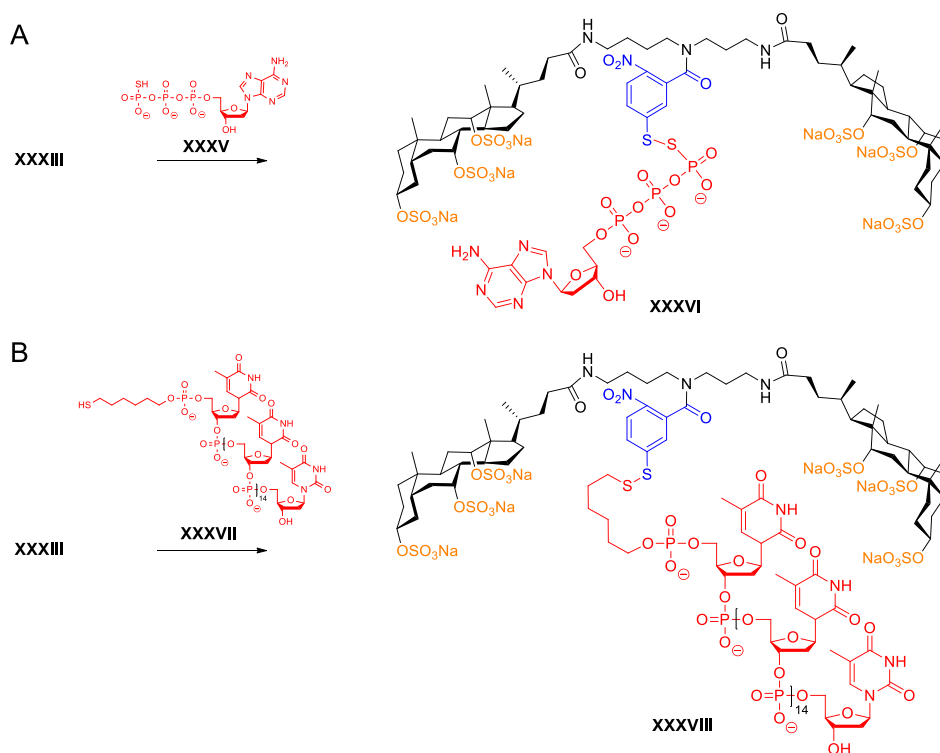


Rysunek 27. Synteza koniugatu parasola molekularnego z cząsteczką glutationu z wykorzystaniem łącznika 5-tiolo-2-nitrobenzoilowego labilnego w środowisku aktywności glutationu.

Disulfidowy łącznik 5-tiolo-2-nitrobenzoesowy został także wykorzystany przez Regena i współpracowników¹⁶⁷ do tworzenia labilnego połączenia parasoli molekularnych z cząsteczkami nukleotydów i oligonukleotydów. W podejściu tym ponownie wykorzystano jako substraty dimery **XXXIII** zawierające w swojej konstytucji wiązanie disulfidowe (Rysunek 27). Tworzenie niesymetrycznego wiązania disulfidowego z cząsteczką nukleotydu wymagało modyfikacji cząsteczki adenosynotrifosforanu (ATP) na terminalnym ugrupowaniu fosforanowym **XXXV**, w którym grupa hydroksylowa została zastąpiona funkcją tiolową. W wyniku reakcji substytucji w układzie disulfidowym otrzymano koniugat parasola molekularnego z cząsteczką ATP **XXXVI** (Rysunek 28).¹⁶⁷

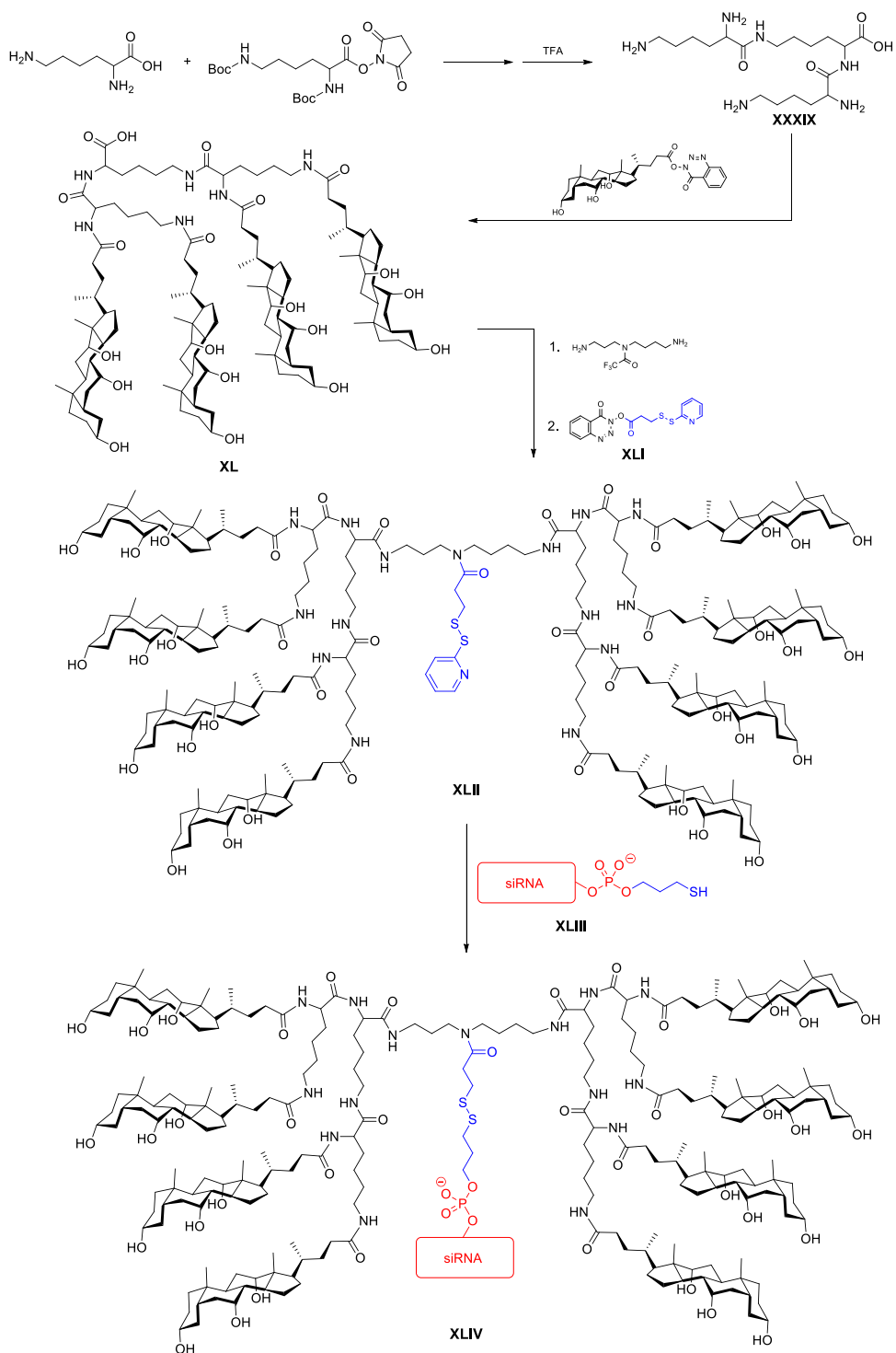
Przeprowadzono także syntezę połączenia parasola z cząsteczką oligonukleotydu, zawierającej w swojej strukturze 16 reszt nukleotydowych. W tym podejściu syntetycznym, cząsteczka oligonukleotydu została zmodyfikowana na terminalnej reszcie fosforanowej, poprzez przyłączenie wiązaniem estrowym sześciowęglowego łańcucha z wolną grupą tiolową na przeciwległym końcu **XXXVII**. Wolne ugrupowanie tiolowe zmodyfikowanego oligonukleotydu posłużyło następnie do tworzenia wiązania disulfidowego z pochodną **XXXIII**, w wyniku czego otrzymano koniugat parasola molekularnego i oligonukleotydu **XXXVIII**.¹⁶⁸

Późniejsze prace Regena i współpracowników¹⁶⁹ opisują zastosowanie innego łącznika bazującego na wiązaniu disulfidowym. Zaproponowany układ zawiera w swojej strukturze pochodną kwasu **3-merkaptopropanowego**, którym acyluje się drugorzędową grupę aminową spermidyny, a funkcja tiolowa służy tworzeniu wiązania sulfidowego z cząsteczką ładunku. Rozwiązanie to zostało zastosowane między innymi w tworzeniu koniugatów parasoli molekularnych z cząsteczką siRNA (Rysunek 29).



Rysunek 28. Schemat syntezy koniugatów parasoli molekularnych: (A) z częścią ATP **XXXVI**; (B) z oligonukleotydem **XXXVIII**.

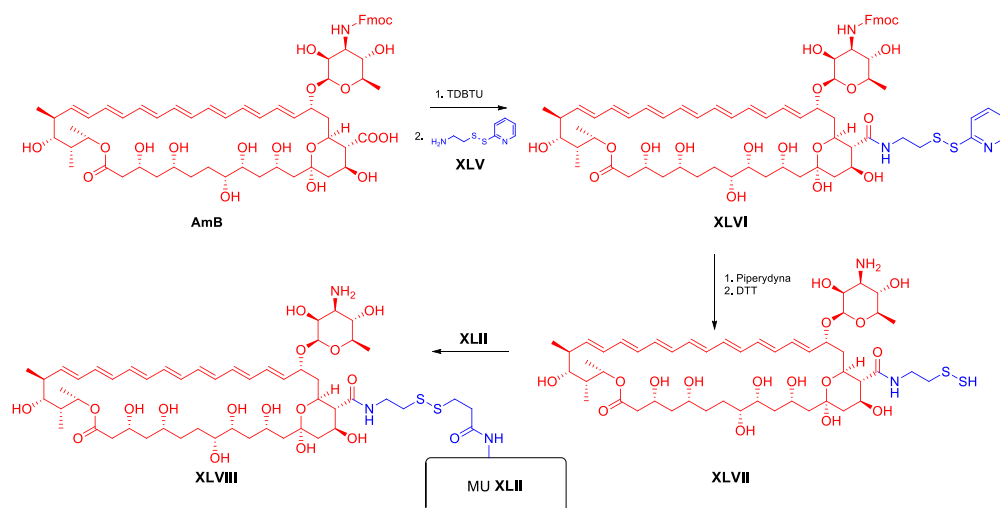
W przeciwieństwie do wcześniejszych badań,¹⁶⁸ przeprowadzono syntezę parasola molekularnego zawierającego w swojej strukturze osiem reszt kwasu cholowego. Syntezę takiego układu rozpoczęto od N-acylowania wolnej części lizyny dwoma molami estru aktywnego NHS Boc₂-lizyny, które po usunięciu grup ochronnych Boc dało produkt **XXXIX**. Natomiast ten ostatni został poddany reakcji sprzężenia z estrem aktywnym TDBTU kwasu cholowego otrzymując pochodną **XL**. Z kolei pochodna **XL** w reakcji tworzenia wiązania amidowego z pierwszorzędowymi grupami aminowymi N²-trifluoroacetylospermidyny i następującej po niej reakcji hydrolizy ugrupowania trifluoroacetylowego, dała jako produkt parasol molekularny zawierający osiem reszt kwasu cholowego. Związek ten w reakcji z estrem aktywnym TDBTU kwasu 3-(2-pirydylosulfanylo)propanowego **XLI**, będącego jednym z komponentów przyszłego wiązania disulfidowego, prowadził do produktu **XLII** – będącego substratem w tworzeniu koniugatów o pożądanej strukturze. Związek **XLII** został następnie poddany reakcji wymiany w ugrupowaniu disulfidowym z odpowiednio zmodyfikowaną częścią siRNA **XLIII**, zawierającą wolną grupę tiolową, uczestniczącą w tworzeniu nowego wiązania disulfidowego końcowego produktu **XLIV** (Rysunek 29).



Rysunek 29. Schemat syntezy koniugatu MU zawierającego osiem reszt steroidowych z cząsteczką siRNA.



Ponadto Regen i współpracownicy¹⁷⁰ przeprowadzili syntezę połączeń parasoli molekularnych zawierających cztery i osiem reszt kwasu cholowego z cząsteczką amfoterycyny B (AmB). Podobnie jak w poprzednio opisanych przypadkach, w tworzeniu tego połączenia zastosowano także disulfidowy łącznik będący pochodną kwasu 3-merkaptopropanowego. Jako substrat wykorzystano wcześniej otrzymany związek **XLII**. W podejściu tym cząsteczka AmB wymagała modyfikacji ugrupowania karboksylowego, które przekształcono w amid w reakcji z 2-(2-pirydylodisulfanylo)etyloaminą **XLV**. Tak otrzymana pochodna **XLVI** została następnie poddana reakcji redukcji za pomocą ditiotreitolu (DTT) do pochodnej tiolowej **XLVII** i wykorzystana do tworzenia wiązania disulfidowego z cząsteczką parasola molekularnego **XLII**. Jako produkt przeprowadzonej reakcji otrzymano koniugat **XLVIII** (Rysunek 30).¹⁷⁰



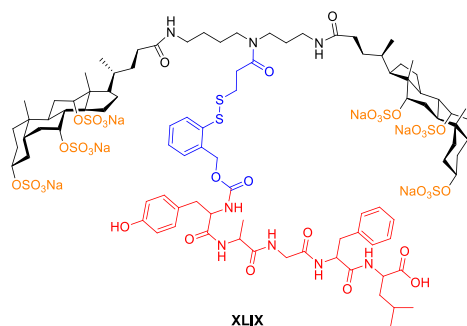
Rysunek 30. Schemat syntezy koniugatu parasola molekularnego z cząsteczką amfoterycyny B.

Podkreślić należy, że wszystkie do tej pory wymienione połączenia disulfidowe cząsteczki transportowanej ze strukturą parasola molekularnego wymagają obecności grupy tiolowej w cząsteczce ‘ładunku’. Tym samym prawie zawsze wiąże się to z modyfikacją chemiczną związku transportowanego. Chcąc ominąć tę niedogodność, zastosowano nieco inne podejście wykorzystujące wiązanie disulfidowe jako element struktury odpowiedzialny za uwalnianie cząsteczki ładunku z koniugatu.

Nowym zastosowanym łącznikiem było ugrupowanie ***o*-ditiobenzoilokarbamoilowe**.¹⁷¹ Podejście syntetyczne i zasada działania tego łącznika została szczegółowo opisana w rozdziale „Wyniki i dyskusja” z racji próby wykorzystania takiego układu w badaniach własnych. Zastosowanie nowego łącznika umożliwiło tworzenie koniugatów cząsteczek zawierających grupy aminowe (np.: peptydów) bez konieczności ich modyfikacji chemicznej ukierunkowanej na wprowadzanie ugrupowania tiolowego do struktury. Sprzężanie z nanonośnikiem zachodzi w tym przypadku poprzez generowanie wiązania uretanowego metodą estrów aktywnych NHS. Metodą tą otrzymano połączenie parasola molekularnego z cząsteczką pentapeptydu o sekwencji H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-



OH, gdzie wiązanie z parasolem molekularnym zrealizowano z wykorzystaniem grupy aminowej tyrozyny, otrzymując koniugat **XLIX** z wydajnością około 20%. (Rysunek 31).¹⁷¹

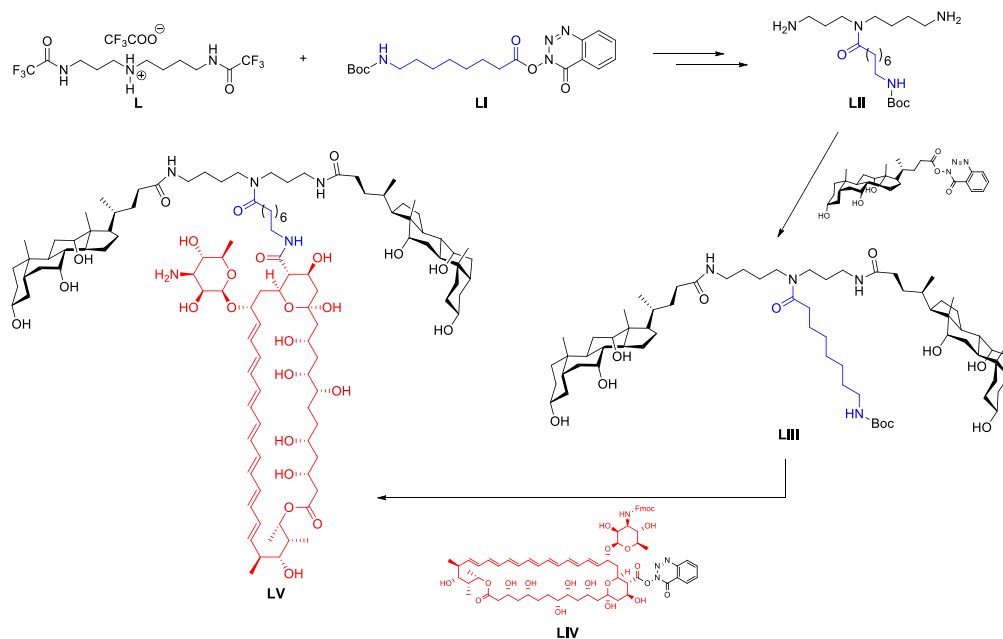


Rysunek 31. Struktura połączenia parasola molekularnego z pentapeptydem poprzez łącznik *o*-ditiobenzoylo-karbamoilowy.

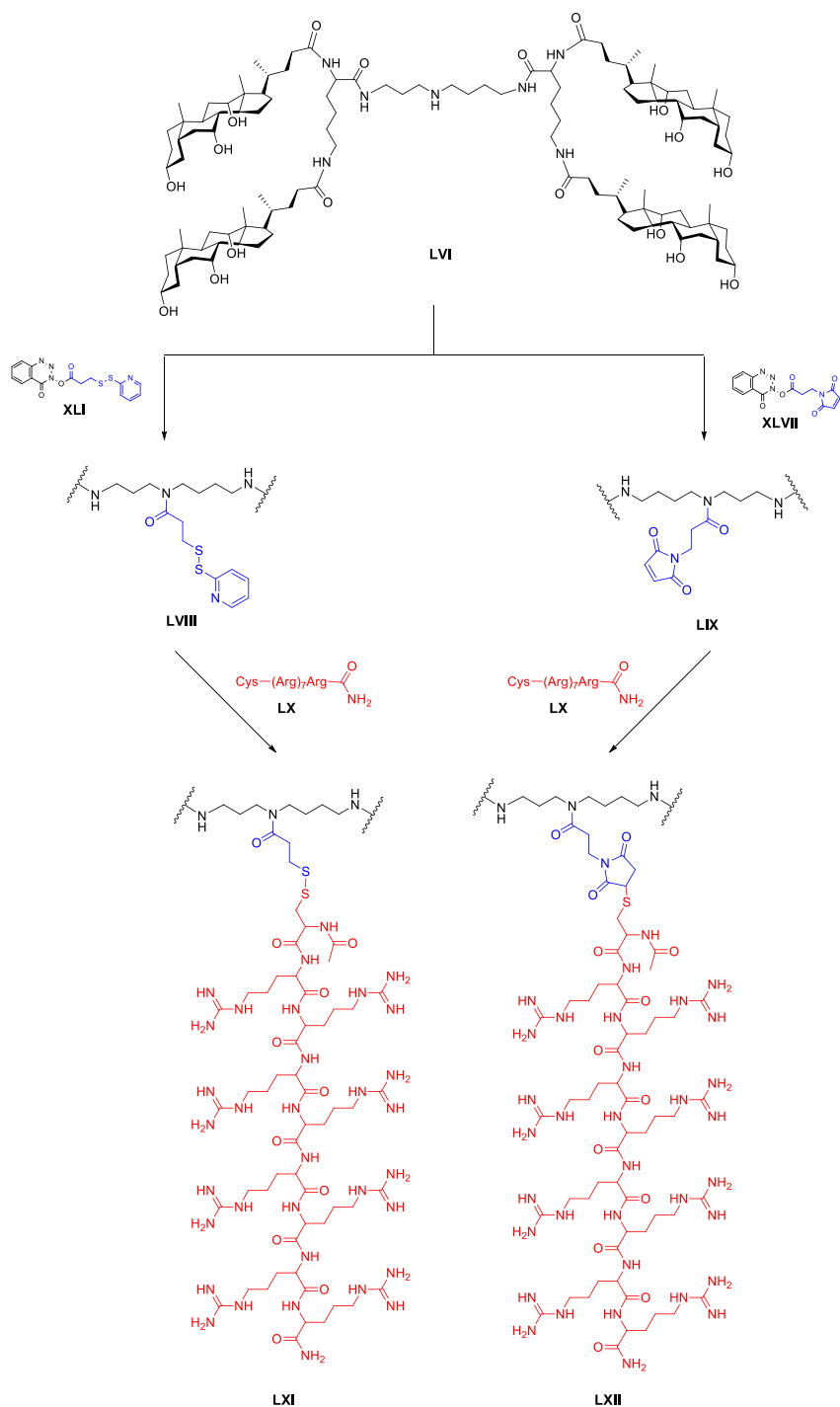
Badania prowadzone przez Regena i współpracowników¹⁷² nad zwiększeniem selektywnej toksyczności amfoterycyny B, doprowadziły do otrzymania koniugatów parasoli molekularnych z cząsteczką amfoterycyny B. W przeciwieństwie do wcześniej opisanych połączeń z AmB, parasol molekularny połączony był za pośrednictwem ośmiowęglowego łącznika ω -aminoacylowego, tworzącego dwa wiązania amidowe: z drugorzędową grupą aminową parasola oraz karboksylową grupą amfoterycyny B. W tym przypadku podejście syntetyczne polegało na początkowym utworzeniu połączenia spermidyna-łącznik, które otrzymano na drodze kondensacji N^1, N^3 -bis(trifluoroacetylo)-chronionej cząsteczki spermidyny **L** z estrem aktywnym TDBTU kwasu *N*-Boc-8-aminooktanowego **LI**. Otrzymany w ten sposób amid **LII** posłużył jako substrat w reakcji tworzenia wiązań amidowych z resztami kwasu cholowego, aktywowanymi estrem TDBTU. Otrzymany parasol molekularny **LIII** po usunięciu grupy ochronnej Boc, został poddany reakcji kondensacji z estrem aktywnym TDBTU *N*-Fmoc-chronionej amfoterycyny B **LIV**. Następujące po reakcji kondensacji usuwanie ochrony Fmoc grupy aminowej AmB doprowadziło do otrzymania końcowego koniugatu **LV** (Rysunek 32).¹⁷²

Regen i współpracownicy¹⁷³ opracowali także metody syntezy parasoli molekularnych zdolnych do tworzenia koniugatów z nukleotydami i kwasami nukleinowymi na drodze oddziaływań niekowalencyjnych – elektrostatycznych. Połączenia tego typu otrzymano stosując dwie strategie syntetyczne. W obu podejściach przeprowadzono syntezy dwu- i czterosteroidowych parasoli molekularnych posiadających wolne drugorzędowe grupy aminowe **LVI**. Otrzymane struktury „zaopatrzone” następnie w dwa różne łączniki (Rysunek 33). Pierwszy z nich to wykorzystany już wcześniej łącznik bazujący na kwasie 3-merkaptopropanowym, którego prekursorem jest ester aktywny TDBTU kwasu 3-(2-pirydylodisulfanylo)-propanowego **XLI**. Drugi rodzaj łącznika bazuje z kolei na strukturze kwasu *N*-(3-karboksypropylo)maleimidu, którego prekursorem jest jego ester aktywny TDBTU **LXVIII**. Otrzymane połączenia parasoli molekularnych **LVIII** i **LIX** ze wspomnianymi łącznikami poddane zostały następnie sprzęganiu z amidem cysteinyllooktaargininy **LX**. W wyniku kondensacji otrzymano koniugaty **LXI** i **LXII** różniące się sposobem połączenia peptydu z cząsteczką nośnika (Rysunek 33). Należy zauważyć, że

pochodna **LXI** posiada labilny układ disulfidowy, mogący ulegać lizie na skutek aktywności komórkowego glutationu. W przypadku koniugatu **LXII** powstały na skutek addycji Michaela układ jest raczej trwały i nie ulega szybkiej lizie w warunkach komórkowych. Reszta argininy, a właściwie grupy guanidynowe łańcuchów bocznych w postaci sprotonowanej stanowią elektrostatyczny „zaczep” dla ujemnie naładowanych reszt fosforanowych obecnych w nukleotydach i kwasach nukleinowych (Rysunek 33).¹⁷³



Rysunek 32. Synteza połączenia parasola molekularnego zaopatrzonego w łącznik ω-aminoacylowy z cząsteczką amfoterycyny B.



Rysunek 33. Droga otrzymywania połączeń parasoli molekularnych z oktaargininą, stanowiącą jonowy „zaczep” dla kwasów nukleinowych.

ROZDZIAŁ 4

4. Cel i zakres pracy

Głównym celem badań, których wyniki opisano w niniejszej pracy doktorskiej, było zaprojektowanie i synteza tzw. parasoli molekularnych, pochodnych kwasów żółciowych i spermidyny oraz ich koniugatów z inhibitorami enzymatycznymi o strukturze aminokwasowej, jako potencjalnych związków o działaniu przeciwrzybowym.

Realizacja postawionego celu wymagała:

- 1) opracowania metod syntezy substratów niezbędnych do otrzymywania koniugatów, przede wszystkim parasoli molekularnych o określonej konstytucji,
- 2) opracowania i optymalizacji metod syntezy połączeń parasoli molekularnych ze związkami o działaniu przeciwrzybowym,
- 3) sprawdzenie możliwości wykorzystania do konstrukcji koniugatów parasoli molekularnych kilku rodzajów łączników labilnych.

W zakres przeprowadzonych badań wchodziły następujące zadania szczegółowe:

- 1) synteza parasoli molekularnych,
- 2) synteza bezpośrednich połączeń parasoli molekularnych z kwasem (*S*)-*N*³-(4-metoksyfumaroylo)-2,3-diaminopropanowym (FMDP),
- 3) opracowanie metody syntezy łącznika typu 'trimethyl lock',
- 4) opracowanie metody syntezy koniugatów parasoli molekularnych ze związkami biologicznie aktywnymi: kwasem (*S*)-*N*³-(4-metoksyfumaroylo)-L-2,3-diaminopropanowym (FMDP) oraz (1*R*,2*S*)-*cis*-pentacyną, połączonymi za pośrednictwem łączników labilnych,
- 5) synteza koniugatów parasoli molekularnych ze związkami fluorescencyjnymi: dansyloglicyną i Lys(Mca),
- 6) identyfikacja otrzymanych pochodnych z wykorzystaniem technik spektroskopowych ¹H NMR, ¹³C NMR, FTIR oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas HRMS-ESI.



ROZDZIAŁ 5

5. Wyniki i dyskusja

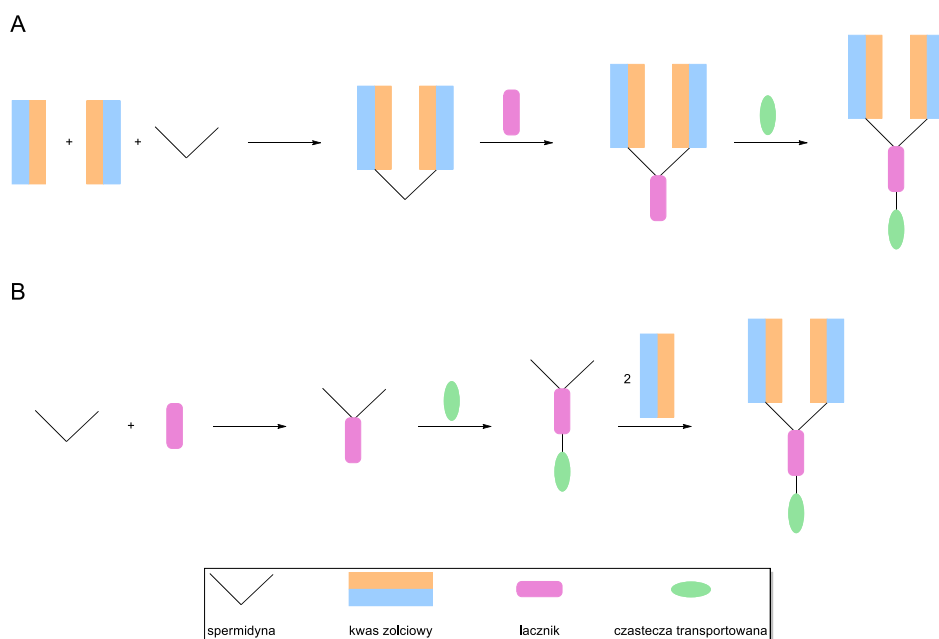
Obecnie istnieje stosunkowo niewiele leków o skutecznej aktywności przeciwgrzybowej, które stosowane w praktyce klinicznej grzybic układowych są bezpieczne dla organizmu pacjenta. Jak już wspominałem wcześniej, przyczyn takiego stanu rzeczy jest wiele, jak chociażby duża cytotoksyczność dla komórek ludzkich, wąskie spektrum działania tych leków czy szybkie nabywanie lekooporności przez wcześniej skutecznie zwalczane szczepy patogennych grzybów. Dlatego wprowadzenie nowych, skutecznych związków o działaniu przeciwgrzybowym mogłoby zapełnić tę lukę. Związki takie, jak FMDP czy *cis*-pentacyna jako silne inhibitory enzymatyczne, mogłyby stać się potencjalnymi lekami. Jednakże ze względu na słabą przenikalność przez błony biologiczne nie znajdują takiego zastosowania. Dlatego od lat poszukiwane są metody skutecznego wprowadzania tych związków do komórek grzybowych. Część z tych sposobów okazała się nietrafiona, zaś inne, pomimo że skuteczne w badaniach, na dłuższą metę nie mogą być stosowane ze względu na szybko nabywaną wobec nich oporność przez komórki patogennych grzybów.

Zainspirowany badaniami Regena¹⁶² nad parasolami molekularnymi, postanowiłem sprawdzić możliwości wprowadzania do patogennych komórek grzybowych wyżej wymienionych inhibitorów, wykorzystując transport realizowany przez parasole molekularne. Wydaje się, że dzięki takiemu zabiegowi z jednej strony omijam problem wysokiej polarności cząsteczek inhibitorów, a jednocześnie komórki grzybowe nie powinny nabywać oporności, ponieważ transport MU odbywa się na drodze bezpośredniego przenikania przez błonę komórkową, a w związku z tym komórka nie ma żadnej możliwości regulowania tego procesu. Budowa parasoli molekularnych pozwala na łatwe łączenie ich z inhibitorami, które mają strukturę aminokwasów. Problemem jest dobór właściwego łącznika pośredniczącego pomiędzy strukturami MU i cząsteczki biologicznie czynnej. Od strony syntezy chemicznej łącznik ten powinien umożliwiać łatwe przyłączanie cząsteczek aktywnych, które wykazują charakter aminokwasowy. Sprzęganie MU z cząsteczką transportowaną powinno odbywać się w jak najmniejszej liczbie etapów i w jak najmniej inwazyjnych warunkach, umożliwiających zachowanie aktywności biologicznej cząsteczek transportowanych. Ponadto łącznik musi ulegać lizie w środowisku cytoplazmy



patogennych komórek grzybowych, powodując tym samym uwolnienie cząsteczki aktywnej w formie natywnej.

W trakcie prowadzonych badań wykorzystałem dwie strategie syntezy docelowych połączeń parasoli molekularnych z cząsteczkami transportowanymi. Pierwsze z podejść syntetycznych polegało na początkowym otrzymaniu struktury parasola molekularnego, późniejszej jego modyfikacji polegającej na konstruowaniu łącznika i ostatecznego sprzęgania z cząsteczką biologicznie czynną (Rysunek 34A). Drugi sposób syntezy zamierzonych struktur, polegał natomiast na początkowej syntezie łącznika, jego kondensacji z odpowiednio ochronioną cząsteczką spermidyny, następnie połączeniu z indywiduum transportowanym i w ostatnim kroku tworzeniu struktury parasola molekularnego (Rysunek 34B). Wspomniane strategie przedstawiłem w sposób poglądowy na Rysunku 34.



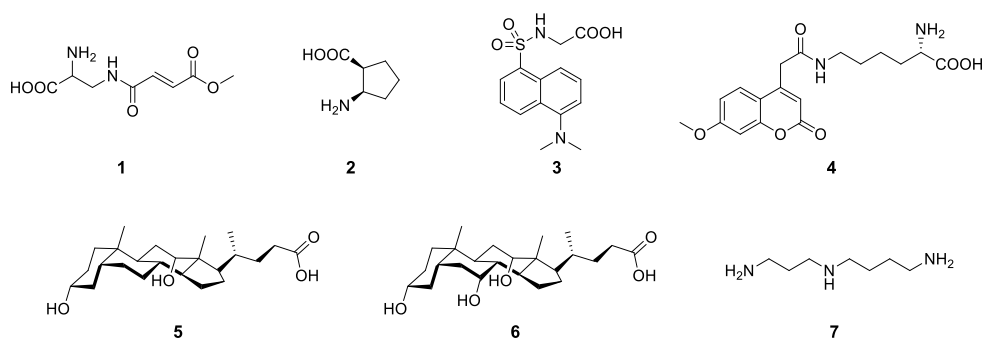
Rysunek 34. Zastosowane strategie syntezy koniugatów parasoli molekularnych z cząsteczkami transportowanymi. (A) strategia oparta o początkową syntezę parasoli molekularnych i późniejsze dołączenie cząsteczki łącznika i substancji transportowanej; (B) strategia oparta o początkowe łączenie cząsteczki łącznika z substancją transportowaną i późniejsze tworzenie struktury parasola molekularnego.

Otrzymane przeze mnie koniugaty charakteryzują się różnymi sposobami połączenia cząsteczki transportowanej ze strukturą parasola molekularnego. W najprostszym wariantcie indywiduum transportowane połączone jest bezpośrednio z drugorzędową grupą aminową spermidyny. W pozostałych przypadkach pomiędzy strukturą transportera i cząsteczki ‘ładunku’ pośredniczy specyficzny łącznik wykazujący potencjalną labilność w środowisku cytoplazmy patogennych komórek grzybowych. Jednym z zastosowanych łączników jest dipeptyd o strukturze ω -aminokwasu, połączonego ugrupowaniem karboksylowym z drugorzędową grupą aminową spermidyny, a funkcją aminową z L-alaniną. W połączeniu tym reszta alaniny służy jako bezpośredni „zaczep” dla



cząsteczki transportowanej. Takie koniugaty cząsteczki transportowanej z parasolem molekularnym zostały przeze mnie otrzymane z wykorzystaniem strategii syntezy zaprezentowanej na Rysunku 34A. Drugim rodzajem łącznika jest ugrupowanie 'trimethyl lock'. Łącznik ten połączony jest za pośrednictwem funkcji karboksylowych z parasolem molekularnym oraz z cząsteczką transportowaną. Pochodne zawierające w swojej konstytucji układ 'trimethyl lock' otrzymałem w oparciu o strategię przedstawioną na Rysunku 34B.

W trakcie badań otrzymałem pochodne będące koniugatami parasoli molekularnych z FMDP **1**, *cis*-pentacyną **2**, dansyloglicyną **3** i Lys(Mca) **4**. Wszystkie struktury otrzymanych parasoli molekularnych to połączenia komercyjnie dostępnego kwasu deoksycholowego **5**, cholowego **6** i spermidyny **7** (Rysunek 35).

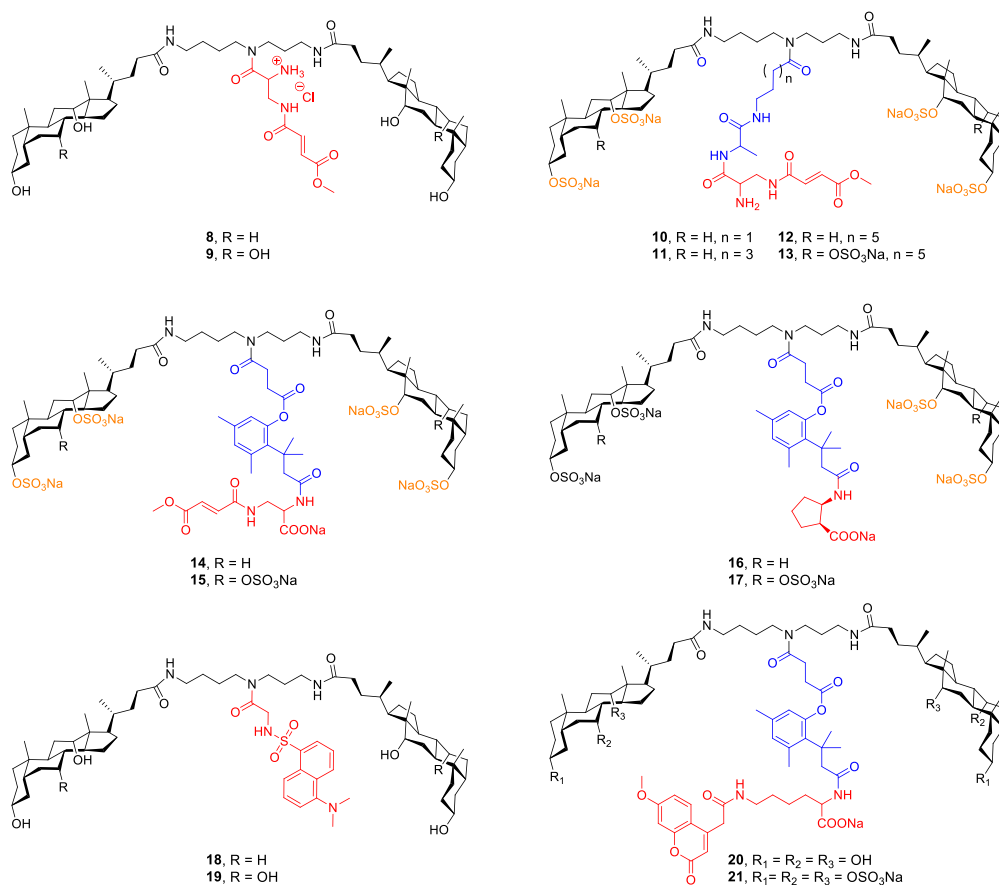


Rysunek 35. Struktury chemiczne cząsteczek biologicznie aktywnych i fluorescencyjnych zastosowanych w tworzeniu połączeń z parasolami molekularnymi: FMDP **1**, *cis*-pentacycyna **2**, dansyloglicyna **3**, Lys(Mca) **4** oraz komponenty struktur parasoli molekularnych: kwas deoksycholowy **5**, kwas cholowy **6** i spermidyna **7**.

Podstawową strukturą parasola molekularnego zastosowaną w moich badaniach była wersja kwasu cholowego lub deoksycholowego, których grupy hydroksylowe zostały przekształcone w estry kwasu siarkowego w formie soli sodowej. Wybór ten był uzasadniony wynikami badań Janouta i współpracowników, którzy wykazali, że koniugaty takich parasoli z amfoterycyną B dyfundują przez grzybową błonę komórkową.¹⁷⁰

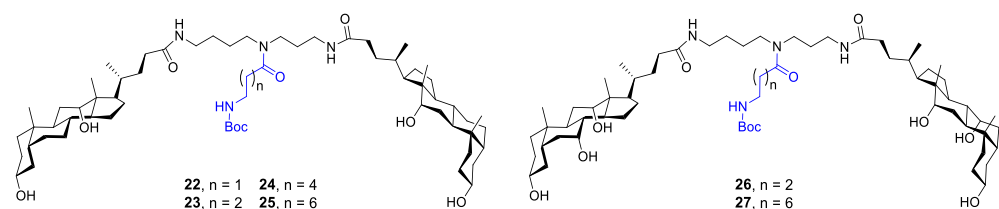
W trakcie badań otrzymałem czternaście pochodnych stanowiących połączenia parasoli molekularnych z cząsteczkami biologicznie czynnymi: FMDP **8-15**, *cis*-pentacyną **16-17**, a także z czynnikami fluorescencyjnymi: dansyloglicyną **18-19** i Lys(Mca) **20-21** (Rysunek 36).





Rysunek 36. Struktury otrzymanych docelowych połączeń parasoli molekularnych z cząsteczkami transportowanymi.

Ponadto otrzymałem sześć połączeń parasoli molekularnych, pochodnych kwasu deoksycholowego (**22-25**) i cholowego (**26** i **27**), z ω -aminokwasami, które zostały wykorzystane jako substraty w reakcjach kondensacji z makrolidami polienowymi: amfoterycyną B i nystatyną A₁ (Rysunek 37). W wyniku tych kondensacji otrzymano 12 koniugatów, w tym 6 z amfoterycyną B (**69-73**) i 6 z nystatyną (**74-79**).

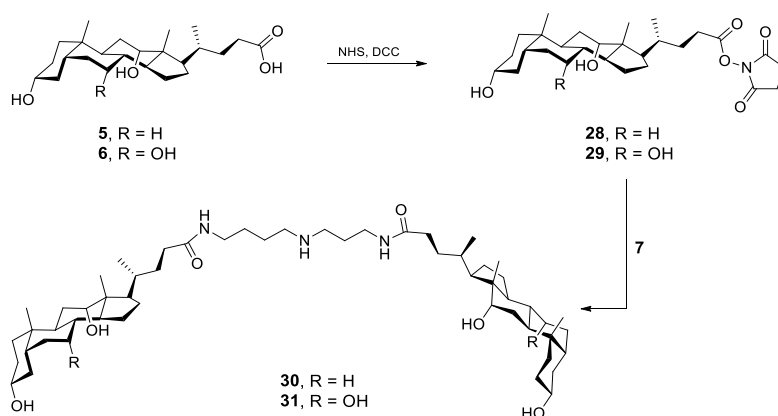


Rysunek 37. Połączenia parasoli molekularnych z Boc chronionymi ω -aminokwasami, przeznaczone do sprzęgania z amfoterycyną B i nystatyną A₁.

5.1. Synteza bezpośrednich połączeń parasoli molekularnych z cząsteczkami transportowanymi

5.1.1. Synteza parasoli molekularnych

Aby zrealizować cele niniejszej pracy badawczej przeprowadziłem syntezę parasoli molekularnych – pochodnych kwasu cholowego lub deoksycholowego i spermidyny. Metodę opracowałem w oparciu o prace Janouta i współpracowników¹⁷⁴ oraz Okahaty i współpracowników,¹⁷⁵ bazujące na tworzeniu wiązania amidowego z wykorzystaniem metody *N*-hydroksysukcynimidylowych estrów aktywnych kwasu cholowego (Rysunek 38). Opisana w literaturze procedura została przeze mnie zmodyfikowana na etapie izolacji i oczyszczania produktów reakcji oraz zaadoptowana do otrzymywania parasoli molekularnych, pochodnych kwasu deoksycholowego.



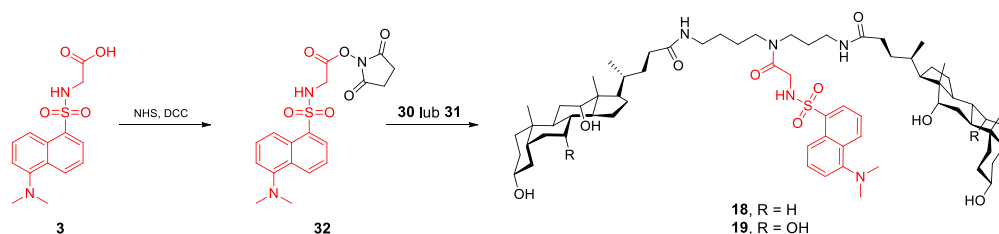
Rysunek 38. Droga syntezy prostych parasoli molekularnych metodą *N*-hydroksysukcynimidylowych estrów aktywnych.

Synteza wiązania amidowego techniką NHS-DCC, w pierwszym etapie wymagała aktywacji ugrupowania karboksylowego odpowiedniego kwasu żółciowego **5** lub **6** poprzez tworzenie estru *N*-hydroksysukcynimidylowego z wykorzystaniem *N*-hydroksysukcynimidu i *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) jako odczynnika kondensującego. Otrzymane tą metodą estry aktywne **28** i **29** oczyszczałem poprzez krystalizację. W kolejnym etapie estry poddawałem procesowi sprzęgania z pierwszorzędowymi grupami aminowymi spermidyny **7**. Operacje oczyszczania oparte o preparatywną cieczową chromatografię kolumnową doprowadziły do wyizolowania chromatograficznie czystych produktów **30** i **31**. Otrzymane parasole molekularne posłużyły w późniejszych badaniach jako materiał wyjściowy do syntezy kolejnych pochodnych.

5.1.2. Synteza połączeń parasoli molekularnych z dansyloglicyną i FMDP

Kolejnym celem pracy doświadczalnej było otrzymanie koniugatów parasoli molekularnych **30** i **31** z indywidualnym fluorescencyjnym – dansyloglicyną (DansGly) **3**. Związki te są niezbędne do zbadania transportu parasoli molekularnych do wnętrza

komórek ssaczych i grzybowych. Do otrzymania takich pochodnych ponownie wykorzystałem metodę *N*-hydroksysukcynimidylowych estrów aktywnych (Rysunek 39).



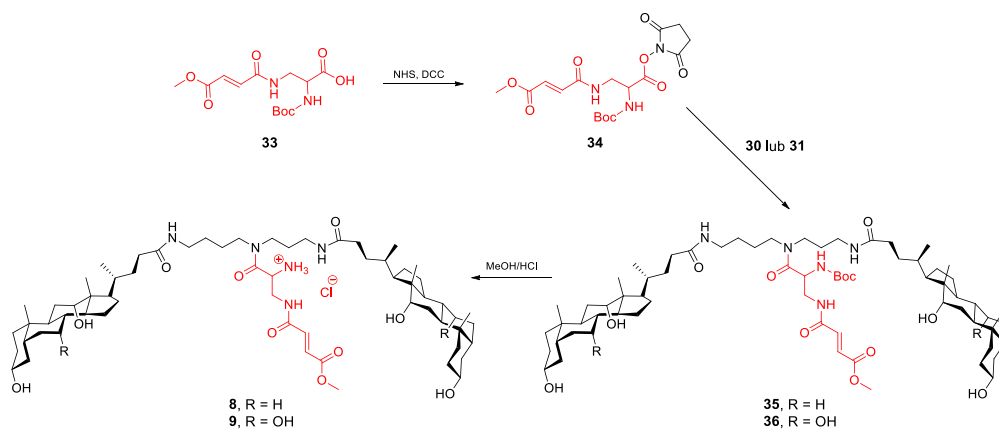
Rysunek 39. Droga syntezy fluorescencyjnych pochodnych parasoli molekularnych.

Ze względu na labilność danyloglicyny, wszystkie operacje i procesy jednostkowe przebiegające z jej udziałem prowadziłem w warunkach ograniczonego dostępu promieniowania świetlnego. Otrzymany ester aktywny danyloglicyny **32** poddałem procesowi sprzęgania z odpowiednimi parasolami molekularnymi **30** i **31**. Produkty kondensacji **18** i **19** oczyściłem na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, otrzymując je w postaci chromatograficznie czystej.

Aby sprawdzić czy do aktywności inhibitorów połączonych z parasolami molekularnymi niezbędne są dodatkowe łączniki w/w struktur, postanowiłem otrzymać bezpośrednie koniugaty tych związków. W analogiczny sposób do opisanego wyżej przeprowadziłem syntezy koniugatów parasoli molekularnych **30** i **31** z inhibitorem enzymu syntazy glukozamino-6-fosforanu – FMDP **1**. Podobnie jak poprzednio jako „narzędzie” sprzęgające zastosowałem estry aktywne, a mianowicie ester *N*-hydroksysukcynimidylowy Boc-FMDP **34**, który zsyntezowałem z Boc-FMDP **33** otrzymanego przez mgr inż. Joannę Skok. Otrzymany ester aktywny **34** stosowałem w dalszych etapach bez dodatkowego oczyszczania. W wyniku sprzęgania estru **34** ze związkami **30** i **31** otrzymałem odpowiednie koniugaty **35** i **36**, które oczyściłem na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Pochodne **35** i **36** posiadają w swojej strukturze Boc-chronioną grupę α -aminową w reszcie FMDP, którą usiłowałem usunąć stosując TFA jako standardowy odczynnik deprotekcyny. Jednakże analiza TLC wykazała, że otrzymane związki są labilne w środowisku tego kwasu. Dlatego przeprowadziłem proces usuwania ochrony Boc z zastosowaniem łagodniejszego środowiska reakcji, wykorzystując bezwodny metanol nasycony gazowym chlorowodorem. Zmiana ta przyniosła oczekiwany wynik i doprowadziła do usunięcia ochrony z grupy aminowej z zadowalającą wydajnością, co skutkowało otrzymaniem pochodnych **8** i **9** (Rysunek 40). Strukturę chemiczną otrzymanych związków potwierdziłem za pomocą spektroskopii NMR oraz spektrometrii mas.

Podczas otrzymywania pochodnych parasoli molekularnych **8**, **9**, **18** oraz **19** zapoznałem się z metodyką syntezy, izolacji oraz oczyszczania tytułowych związków, co zaowocowało cennymi informacjami przydatnymi w dalszych postępowaniach syntetycznych.





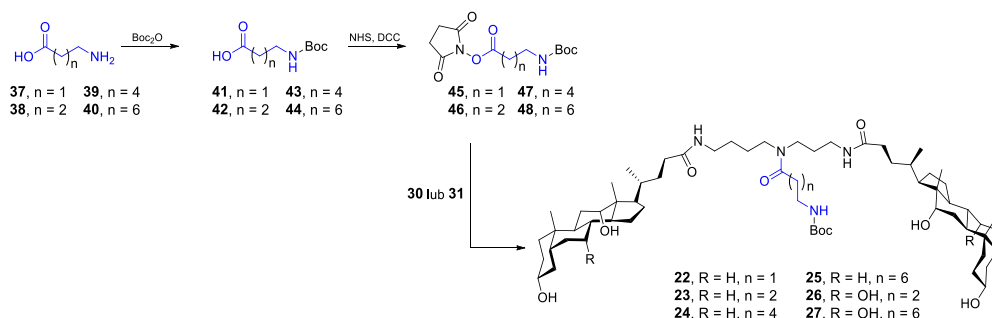
Rysunek 40. Syntezy koniugatów parasoli molekularnych z chlorowodorkiem FMDP.

Fluorescencyjne pochodne **18** i **19** poddane zostały wstępnym badaniom biologicznym, mającym potwierdzić ich zdolność do penetracji w poprzek błony biologicznej patogennych komórek grzybowych, a związki **8** i **9** posłużyły do wstępnej oceny aktywności biologicznej oraz wyznaczenia kolejnych założeń pracy syntetycznej. Badania wykonane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej potwierdziły zdolność do przenikania przez błony biologiczne oraz wykazały pewną, choć niezadowalającą, aktywność przeciwrzybową pochodnych **8** i **9**. Podkreślić należy, że parasole molekularne **30** i **31** także wykazują niewielką aktywność grzybobójczą. Najprawdopodobniej aktywność ta związana jest z lokowaniem się układów steroidowych parasoli molekularnych w błonie biologicznej i zaburzeniem jej naturalnego stanu. Lokowanie się parasoli molekularnych, niosących cząsteczkę aktywną, jest w tym przypadku niepożądane, ponieważ cel molekularny cząsteczki FMDP zlokalizowany jest w cytoplazmie komórki grzybowej. Analiza wyników badań doprowadziła do dwóch zasadniczych wniosków: (i) należałoby otrzymać koniugaty parasoli molekularnych połączonych z cząsteczką FMDP w taki sposób, aby cząsteczka ta ulegała odszczepieniu od struktury nośnika w formie natywnej w środowisku cytoplazmy patogennych komórek grzybowych oraz (ii) tak zmodyfikować strukturę nośnika, aby nie ulegał agregacji w biwarstwie lipidowej, a tym samym skutecznie transportował cząsteczkę ‘ładunku’ do wnętrza komórki.

5.2. Synteza parasoli molekularnych z łącznikiem ω-aminoacylowym

Opierając się o wspomnianą wcześniej strategię syntezy koniugatów parasoli molekularnych, postanowiłem otrzymać połączenia ω-aminokwasów z parasolami molekularnymi. Droga syntezy tych połączeń polegała na tworzeniu wiązania amidowego pomiędzy grupami karboksylowymi odpowiednio chronionych ω-aminokwasów a wolną grupą aminową gotowych struktur parasolowych **30** i **31**. Syntezę zaplanowanych struktur rozpocząłem od ochrony grup aminowych komercyjnie dostępnych kwasów: 3-aminopropanowego **37**, 4-aminobutanowego **38**, 6-aminoheksanowego **39** oraz 8-aminooktanowego **40** ugrupowaniem *tert*-butoksykarbonylowym, wykorzystując w tym

celu standardową procedurę ochrony grup aminowych aminokwasów przy pomocy węglanu di-*tert*-butyłu. Wyizolowane *N*-Boc-chronione pochodne **41-44**, przekształciłem następnie w estry *N*-hydroksysukcynimidylowe **45-48**, stosując w tym celu technikę NHS-DCC (Rysunek 41).



Rysunek 41. Schemat syntezy połączeń MU z ω -aminokwasami techniką NHS-DCC.

Następnie estry aktywne **45-48**, oczyszczone na drodze krystalizacji, poddałem reakcji kondensacji ze strukturami parasolowymi **30** i **31**, otrzymując Boc-chronione połączenia **22-27**, które po oczyszczeniu na drodze chromatografii kolumnowej oraz potwierdzeniu struktur za pomocą spektroskopii NMR i spektrometrią mas, przekazałem do dalszych prac syntetycznych.

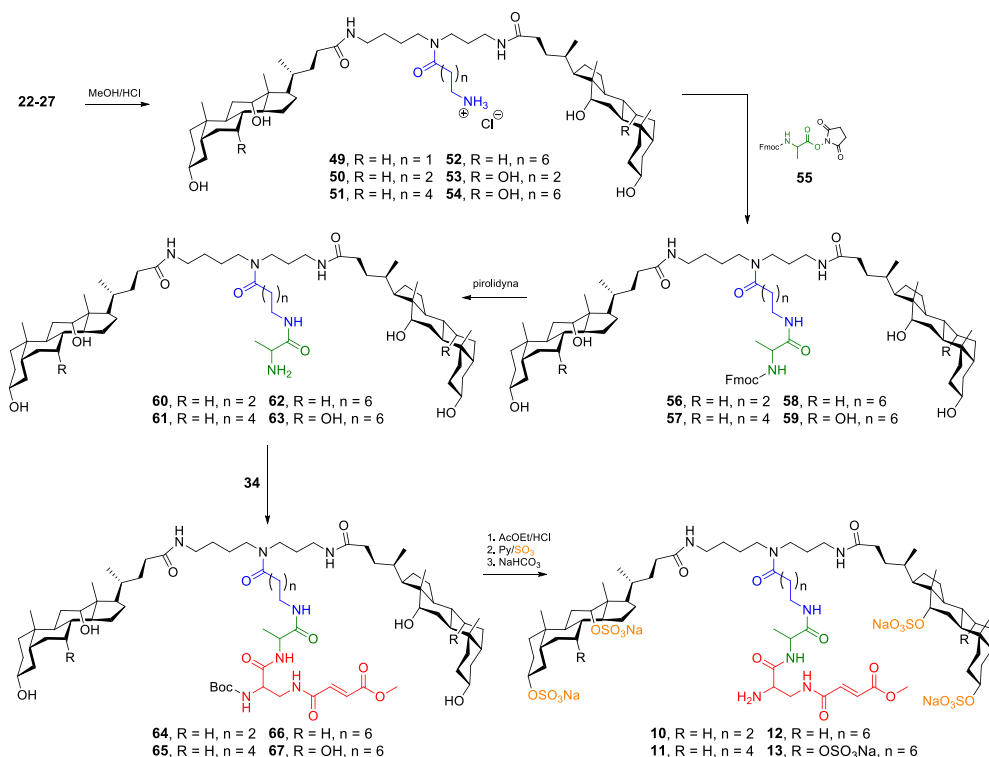
5.2.1. Synteza koniugatów parasoli molekularnych z FMDP z użyciem łączników ω -aminoacylowych

Uważałem, że powinno być również możliwe zastosowanie w badanych koniugatach łącznika o charakterze aminokwasowym w celu ułatwienia uwalniania cząsteczki FMDP w komórkach patogenów. Układ taki powinien ulegać lizie w środowisku cytoplazmy na skutek aktywności komórkowych amidaz, hydrolizujących wiązanie amidowe pośredniczące między cząsteczką FMDP i łącznikiem aminokwasowym. Założyłem, że struktury takich połączeń powinny zawierać wiązanie peptydowe z łatwością rozpoznawalne przez enzymy komórkowe. Tym samym bezpośrednie generowanie wiązania amidowego pomiędzy grupą karboksylową FMDP i aminową łańcucha ω -aminoacylowego wydaje się nieuzasadnione z racji niebiałkowego charakteru obu strukturalnych elementów. Racjonalnym rozwiązaniem wydało się więc być przyłączenie reszty aminokwasu białkowego do ugrupowania ω -aminoacylowego oraz następujące po nim utworzenie wiązania peptydowego z cząsteczką FMDP. Jako aminokwas pośredniczący między strukturą łącznika ω -aminoacylowego i FMDP wybrałem L-alaninę – jest to aminokwas białkowy o nieskomplikowanej strukturze chemicznej (Rysunek 42).

Aby otrzymać zaplanowane połączenia przeprowadziłem reakcję tworzenia wiązania amidowego L-alaniny z pochodnymi ω -aminoacylowymi parasoli molekularnych. W tym celu z pochodnych **22-27** usunąłem ugrupowanie Boc z pierwszorzędowej grupy aminowej układu ω -aminoacylowego poprzez działanie bezwodnym metanolem nasyconym gazowym chlorowodorem. Otrzymane w ten sposób chlorowodorki **49**, **51**, **52** i **54**



wykorzystałem *in situ* jako substraty do sprzężenia z estrem aktywnym Fmoc-L-alaniny. Wcześniej przekształciłem komercyjnie dostępną Fmoc-L-alaninę w jej ester aktywny, stosując w tym celu technikę NHS-DCC. Otrzymany ester **55** oczyszczony na drodze krystalizacji użyłem do tworzenia wiązania amidowego z pochodnymi **50**, **51**, **52** i **54**. Otrzymane Fmoc-chronione układy parasolowe **56-59** oczyściłem na drodze chromatografii kolumnowej i poddałem kolejnej reakcji usuwania ugrupowania Fmoc z grupy α -aminowej alaniny w obecności pirolidyny jako czynnika deprotekcijnego.



Rysunek 42. Droga syntezy koniugatów parasoli molekularnych z cząsteczką FMDP połączonych za pośrednictwem łącznika ω -aminoacylowego.

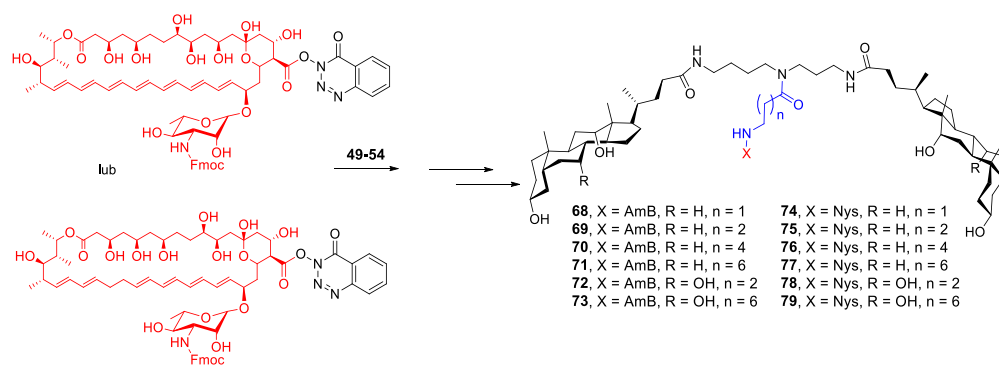
Otrzymane produkty **60-63** po izolacji z mieszaniny reakcyjnej, zostały przeze mnie wykorzystane w dalszym procesie syntetycznym. Pochodne **60-63** są to struktury parasolowe posiadające na drugorzędowej grupie aminowej układ dwu reszt aminokwasowych gotowy do sprzężenia z estrem aktywnym NHS Boc-FMDP **34**. Reakcja generowania wiązania amidowego, późniejsza izolacja i oczyszczanie na drodze chromatografii kolumnowej prowadziły do otrzymania koniugatów **64-67** posiadających w swojej strukturze cząsteczkę FMDP chronioną na ugrupowaniu aminowym. Dwa ostatnie etapy syntezy zamierzonych pochodnych, polegały na usunięciu ugrupowania Boc z grupy aminowej cząsteczki FMDP za pomocą bezwodnego octanu etylu nasyconego gazowym chlorowodorem jako czynnika deprotekcijnego oraz reakcji estryfikacji z zastosowaniem kompleksu Py/SO₃. Produkty po zalkalizowaniu wodorowęglanem sodu przekształciłem w docelowe koniugaty **10-13**, które oczyściłem na drodze chromatografii kolumnowej



(Rysunek 42). Struktury wszystkich produktów pośrednich i końcowych poddałem analizie spektralnej za pomocą spektroskopii NMR i spektrometrii mas. Reasumując, w wyniku opisanych przekształceń otrzymałem koniugaty parasoli molekularnych z cząsteczką FMDP połączone wiązaniem peptydowym za pomocą łącznika diaminokwasowego.

5.2.2. Synteza koniugatów parasoli molekularnych z makrolidami polienowymi z użyciem łączników ω -aminoacylowych

Otrzymane przeze mnie w ramach niniejszej pracy badawczej połączenia parasoli molekularnych **30** i **31** z resztami ω -aminokwasów, zostały także wykorzystane przez mgr inż. Kornelię Skarbek do tworzenia połączeń z cząsteczkami makrolidów polienowych – amfoterycyny B **68-73** oraz nystatyny A₁ **74-79** (Rysunek 43).

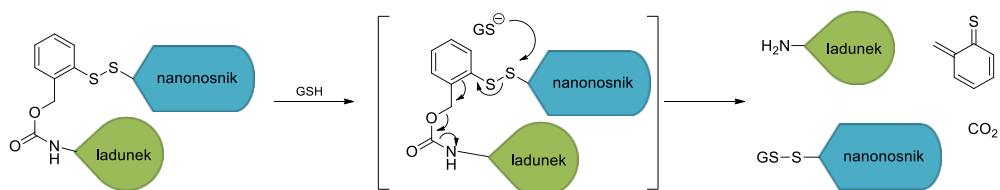


Rysunek 43. Struktury połączeń MU z makrolidami polienowymi, zawierające łączniki ω -aminoacylowe.

5.3. Synteza parasoli molekularnych z łącznikiem *o*-ditiobenzoilokarbamoilowym

Szukając rozwiązania dla postawionych założeń przeprowadziłem analizę danych literaturowych, która wykazała, że, uwalnianie cząsteczki ładunku w formie natywnej może być także uzyskane przy zastosowaniu reszty *o*-ditiobenzoilokarbamoilowej.¹⁷¹

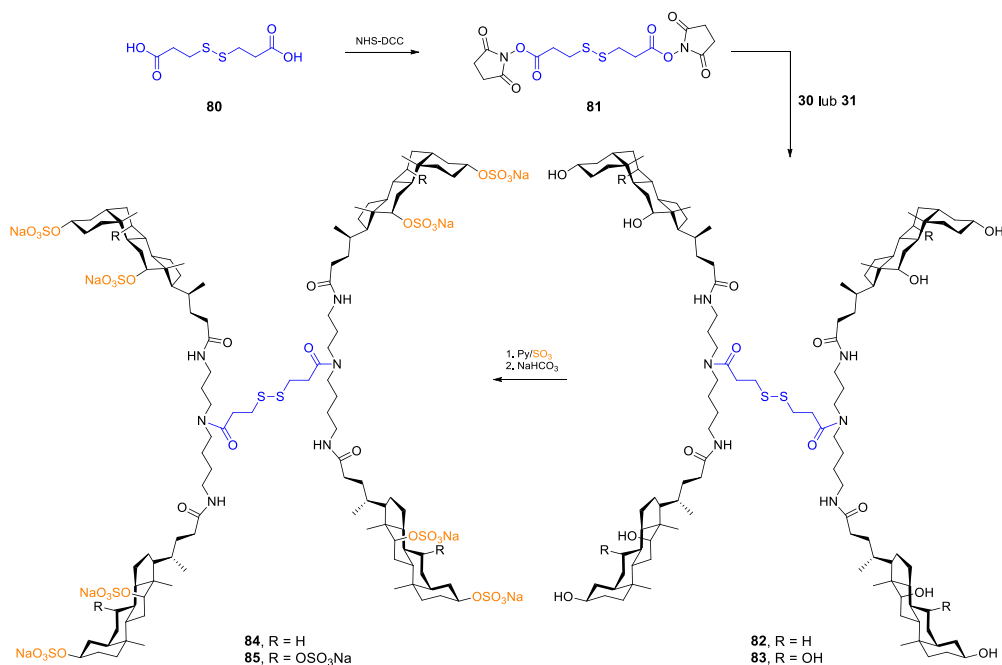
Jing i współpracownicy¹⁷¹ zastosowali nowy rodzaj łącznika, który pod wpływem redukcyjnej aktywności glutationu, obecnego w każdej komórce eukariotycznej, ulega szeregowi przemian chemicznych prowadzących do uwolnienia cząsteczki transportowanej ze struktury nanonośnika w formie natywnej. Łącznikiem tym jest reszta *o*-ditiobenzoilokarbamoilowa zawierająca w swojej strukturze ugrupowanie disulfidowe labilne w środowisku aktywności glutationu. Mechanizm degradacji tego łącznika, prowadzący do uwolnienia cząsteczki ładunku przedstawiłem na Rysunku 44. Po wnিকnięciu do środowiska cytoplazmy układ disulfidowy łącznika ulega rozszczepieniu na skutek nukleofilowego ataku grupy tiolowej cząsteczki glutationu. W rezultacie dochodzi do utworzenia nowego wiązania disulfidowego pomiędzy cząsteczką glutationu i nanonośnika. Struktura łącznika ulega przy tym degradacji prowadzącej do uwolnienia cząsteczki transportowanej w formie natywnej (Rysunek 44).^{171,176}



Rysunek 44. Mechanizm degradacji łącznika *o*-ditiobenzoilokarbamoilowego przez cząsteczkę glutationu, prowadzący do uwolnienia cząsteczki transportowanej w formie natywnej.

Dodatkową zaletą łącznika *o*-ditiobenzoilokarbamoilowego jest możliwość przyłączania dowolnych cząsteczek nie zawierających w swojej strukturze reszt tiolowych, ponieważ łączenie zachodzić może za pośrednictwem grupy aminowej lub hydroksylowej związku dołączanego. W świetle powyższego wydawało mi się, że łącznik *o*-ditiobenzoilokarbamoilowy jest najbardziej predestynowany do łączenia reszt parasoli molekularnych z cząsteczkami inhibitorów enzymatycznych.

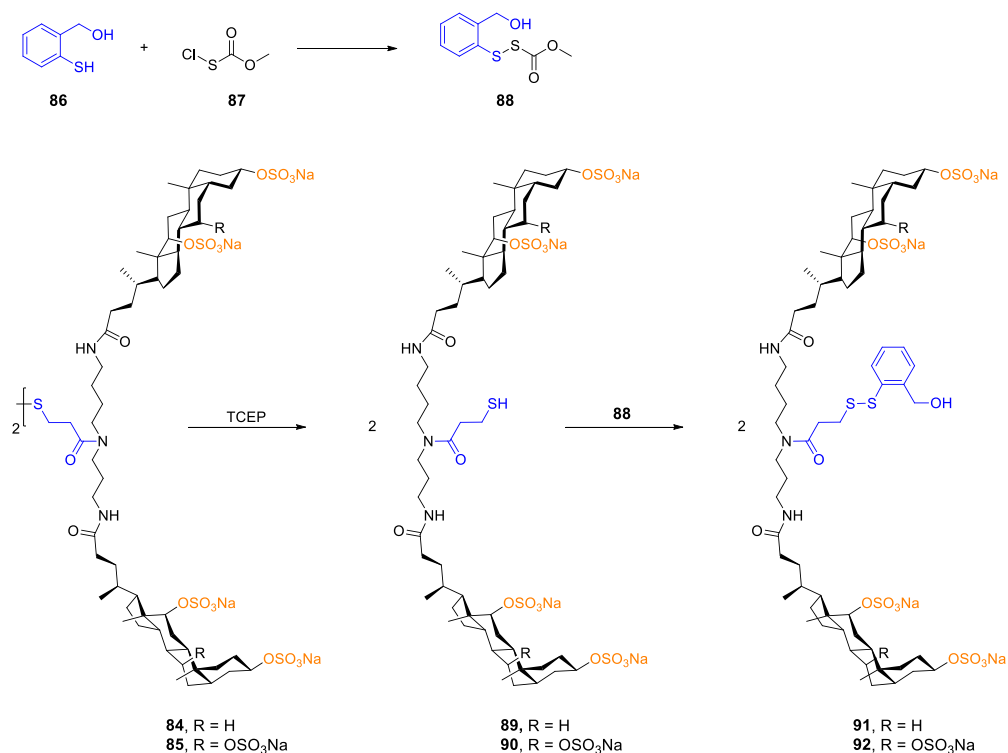
Pracę eksperymentalną, mającą na celu otrzymanie koniugatów z łącznikiem *o*-ditiobenzoilokarbamoilowym, realizowałem w oparciu o prace Regena i współpracowników.¹⁷¹ W pierwszym etapie otrzymałem ester di-*N*-hydroksysukcynimidylowy **81** z kwasu 3,3'-ditiopropanowego **80** wykorzystując w tym celu metodę NHS-DCC. Oczyszczony na drodze krystalizacji diester **81** posłużył w dalszych etapach badań jako indywidualum sprzęgające struktury parasoli molekularnych **30** i **31** do homodimerów **82** i **83** na drodze tworzenia wiązania amidowego z drugorzędowymi grupami aminowymi spermidyny (Rysunek 45).



Rysunek 45. Droga syntezy estrowych homodimerów parasoli molekularnych.

Dimery **82** i **83** poddałem estryfikacji kompleksem Py/SO_3 , a następnie przeprowadziłem w formę soli sodowej estru kwasu siarkowego(VI) na drodze alkalizacji wodnym roztworem wodorowęglanu sodu. W wyniku przeprowadzonej reakcji estryfikacji, izolacji i oczyszczenia produktów na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym otrzymałem siarczany **84** i **85**.

Kluczowym elementem syntezowanych przeze mnie pochodnych jest wiązanie disulfidowe. Syntezę układu z wiązaniem disulfidowym **88** przeprowadziłem wykorzystując komercyjnie dostępne: alkohol 2-merkaptobenzylowy **86** oraz chlorek metoksykarbonylo-sulfenowy **87**. Po sprzęganiu, izolacji i oczyszczeniu produktu otrzymałem niesymetryczny disulfid **88** (Rysunek 46).

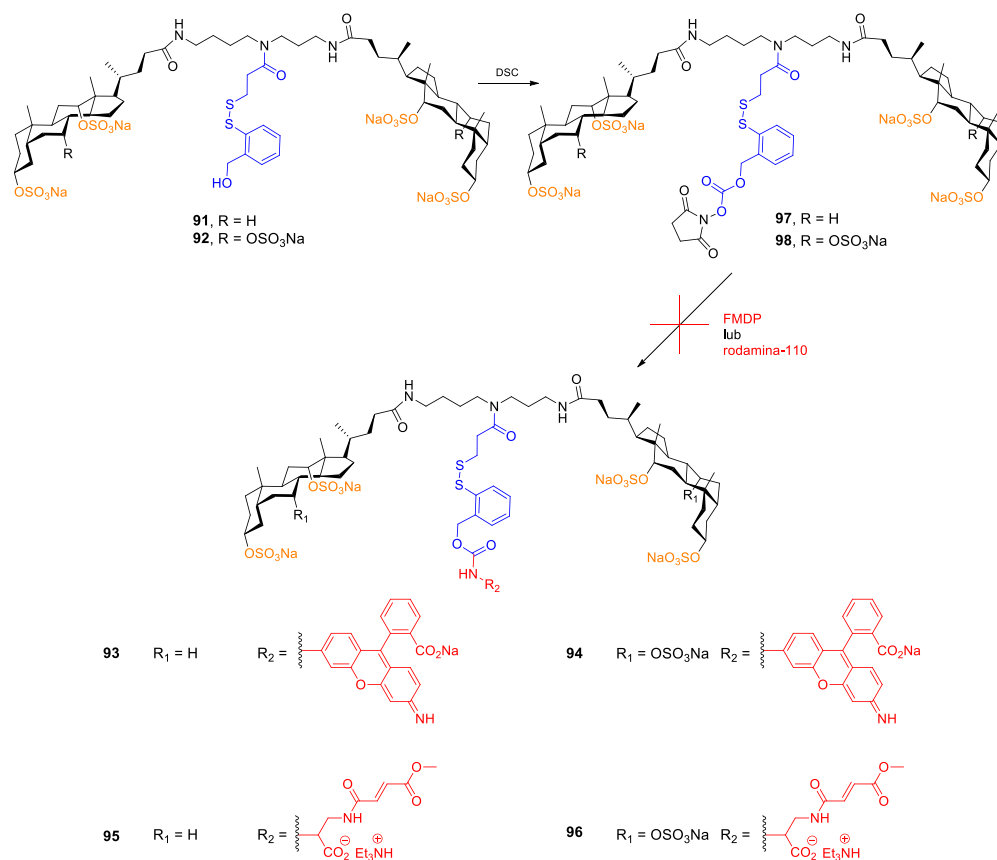


Rysunek 46. Droga syntezy monomerycznych form parasoli molekularnych zaopatrzonych w łącznik o-ditiobenzoilokarbamoilowy.

Otrzymane wcześniej formy dimeryczne **84** i **85** poddałem reakcji rozszczepiania do produktów monomerycznych **89** i **90** na drodze redukcji wiązania disulfidowego chlorowodorkiem tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP) w środowisku buforu fosforanowego o pH 7.3. Po izolacji tiolowych produktów **89** i **90** z mieszaniny poreakcyjnej, poddałem je kondensacji z wcześniej otrzymanym disulfidem **88**, co prowadziło do utworzenia wiązania disulfidowego pomiędzy parasolem molekularnym a alkoholem 2-merkaptobenzylowym. Wyizolowane i oczyszczone przy pomocy chromatografii kolumnowej pochodne **91** i **92** (Rysunek 46) posłużyły jako materiał wyjściowy do tworzenia połączeń z cząsteczką FMDP i czynnikiem fluorescencyjnym – rodaminą 110.



W pierwszej kolejności podjąłem próbę otrzymania koniugatów parasoli molekularnych **93-96**, których struktury przedstawiłem na Rysunku 47. W tym celu pochodne **91** i **92** poddałem reakcji tworzenia wiązania estrowego z udziałem benzylowej grupy hydroksylowej poprzez działanie węglanem di-*N,N'*-hydroksysukcynimidylowym (DSC) otrzymując pochodne **97** i **98**, które posłużyć miały jako wyjściowy substrat w reakcji kondensacji z solą sodową rodamin-110 oraz solą trietyloammoniumową FMDP. Jednakże w żadnym z obu przypadków proces sprzęgania nie powiódł się. Nie otrzymałem w zadowalającej ilości założonych produktów **93-96** (Rysunek 47).



Rysunek 47. Droga syntezy koniugatów MU z FMDP i rodaminą-110 z wykorzystaniem łącznika *o*-ditiobenzoilokarbamoilowego.

Dla sprawdzenia reaktywności węglanu di-*N,N'*-hydroksysukcynimidylu (DSC) przeprowadziłem próbę z cykloheksyloaminą. W wyniku reakcji sprzęgania otrzymałem pochodną typu uretanowego zamiast oczekiwanego *N,N'*-dicykloheksyloamocznika. W przypadku pochodnych fluorescencyjnych **93** i **94** niepowodzenie tworzenia wiązania uretanowego wynika najprawdopodobniej z ograniczonej reaktywności grupy aminowej rodamin-110, ponieważ jest to aromatyczna grupa aminowa. W przypadku pochodnych FMDP **95** i **96** niepowodzenia nie można tłumaczyć aromatycznym charakterem grupy aminowej. Znaczący wpływ na zahamowanie reakcji mają tu najprawdopodobniej uwarunkowania steryczne powodowane przez zmiany konformacyjne struktury parasola

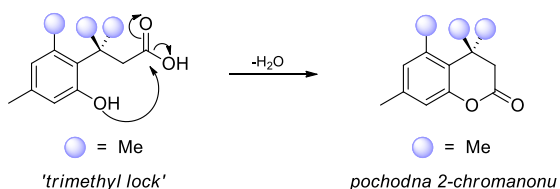


molekularnego oraz niewystarczająca reaktywność estru NHS. Moje prace nad syntezą pochodnych innego typu wykazały, że tworzenie wiązania amidowego z udziałem cząsteczki FMDP za pomocą estrów aktywnych NHS nie zachodzi z dobrą wydajnością, nawet w dużo prostszych układach. W celu zwiększenia wydajności procesu wymagane jest zastosowanie bardziej reaktywnych pochodnych estrów aktywnych, np.: TDBTU. Dokonałem przeglądu komercyjnie dostępnych odczynników kondensujących analogicznych do DSC, będących pochodnymi kwasu węglowego. Jedynymi oferowanymi produktami, odznaczającymi się większą reaktywnością, są fosgen i jego pochodne: difosgen oraz trifosgen. Z racji toksyczności wspomnianych związków oraz niemożności przeprowadzenia reakcji w bezpiecznych warunkach, nie podjąłem się próby ich przetestowania w otrzymywaniu pochodnych **93-96**.

W świetle powyższych obserwacji zarzuciłem ideę zastosowania łącznika *o*-ditiobenzoilokarbamoilowego, uzasadniając słuszność decyzji niemożnością utworzenia wiązania uretanowego w omawianym układzie.

5.4. Synteza parasoli molekularnych z łącznikiem typu 'trimethyl lock'

Kolejnym rodzajem łącznika, który sprawdziłem pod kątem możliwości syntezy koniugatów parasoli molekularnych było ugrupowanie zwane w literaturze anglojęzycznej 'trimethyl lock'. Ugrupowanie 'trimethyl lock' jest pochodną kwasu *o*-hydroksydihydrocynamonowego, w której trzy grupy metylowe zajmują niekorzystne energetycznie pozycje, co uważa się za jedną z sił napędowych reakcji laktonizacji do pochodnej 2-chromanonu.¹⁷⁷ Cechą charakterystyczną ugrupowania 'trimethyl lock' jest to, że proces laktonizacji zachodzi nawet w przypadku tak słabych elektrofilów, jak amidy i złych grup odchodzących jak aminy. Specyficzne właściwości 'trimethyl lock' zostały zaobserwowane po raz pierwszy w latach 60. ubiegłego wieku przez Louisa A. Cohena i Johna W. Thanassisa,¹⁷⁸ którzy tłumaczyli zjawisko laktonizacji zawadą przestrzenną pomiędzy trzema sąsiadującymi ze sobą ugrupowaniami metylowymi. Badania przeprowadzone przez inne grupy badawcze pokazują, że laktonizacja układu jest spowodowana także przez inne zjawiska, a sam proces cyklizacji do 2-chromanonu jest składową wielu czynników (Rysunek 48).¹⁷⁷

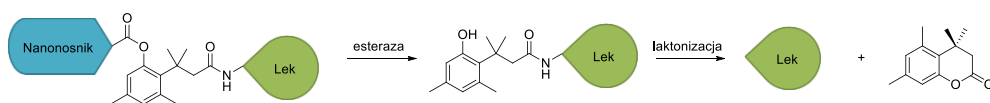


Rysunek 48. Struktura i mechanizm laktonizacji ugrupowania 'trimethyl lock'.

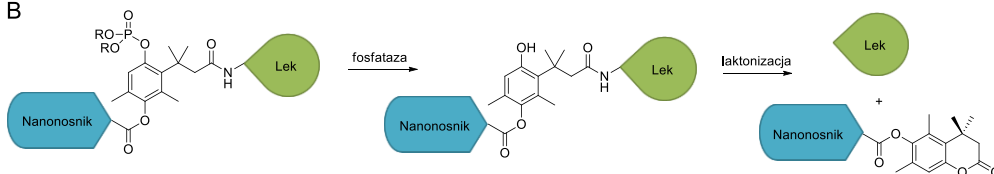
Obserwacje i wnioski wyciągnięte przez Cohena,¹⁷⁸ przyczyniły się w późniejszym czasie do zastosowania 'trimethyl lock' jako elementu składowego proleków, uwalniających cząsteczkę aktywną w odpowiednich warunkach, zależnych od konstytucji układu 'trimethyl lock'. W ostatnich czasach układ ten znajduje także zastosowanie jako łącznik pośredniczący między cząsteczką aktywną i nanoosiłkiem, którym jest związek o charakterze sideroforu, wspomagającego transport w poprzek błony komórkowej.^{141,179}

Późniejsze modyfikacje układu ‘trimethyl lock’ doprowadziły do wypracowania trzech ogólnych struktur uwalniających cząsteczkę ‘ładunku’ wewnątrz komórki na skutek działania trzech różnych klas enzymów. Pierwszy rodzaj łącznika to układ ‘trimethyl lock’ labilny w środowisku esteraż komórkowych (Rysunek 49A). Acetylowana na grupie hydroksylowej pochodna ‘trimethyl lock’ ulega hydrolizie na skutek czego uwolniona fenolowa grupa hydroksylowa bierze udział w procesie laktonizacji prowadzącym do uwolnienia cząsteczki leku. Drugi rodzaj łącznika to ester kwasu fosforowego, hydrolizowany w warunkach aktywności fosfataż (Rysunek 49B). Podobnie jak w poprzednim przypadku, uwolniona grupa hydroksylowa bierze udział w procesie cyklizacji, po czym następuje uwolnienie cząsteczki leku. Trzeci rodzaj łącznika to układ benzochinonu, który pod wpływem działania oksydoreduktaz zostaje zredukowany do fenolu co skutkuje wspomnianą wcześniej laktonizacją (Rysunek 49C).¹⁸⁰

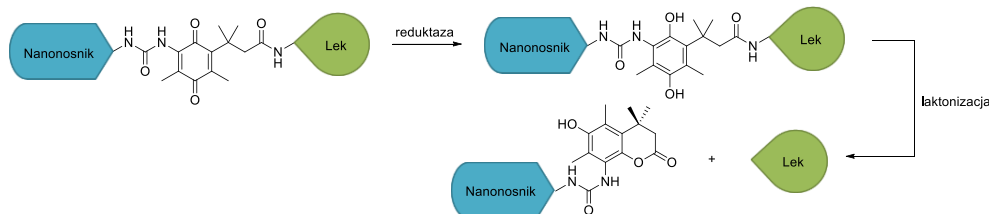
A



B



C



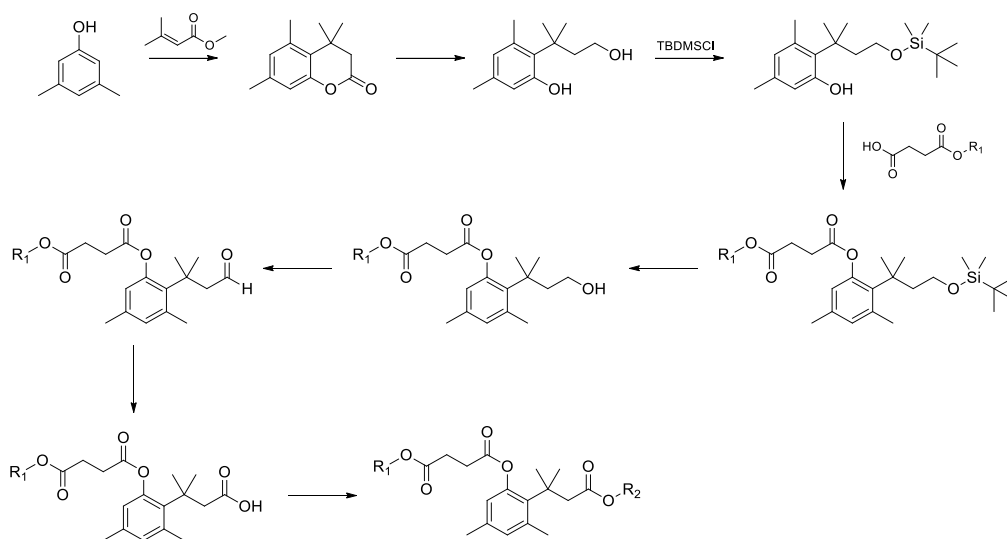
Rysunek 49. Różne typy łącznika ‘trimethyl lock’. (A) łącznik labilny w środowisku aktywności esteraż; (B) łącznik labilny w środowisku aktywności fosfataż; (C) łącznik labilny w środowisku aktywności oksydoreduktaz.

Zainspirowany badaniami Millera i Ji,^{140,141} nad zastosowaniem układu ‘trimethyl lock’ w transporcie sideroforowym, postanowiłem przeprowadzić próbę syntezy parasoli molekularnych zawierających w swojej strukturze wspomniany łącznik. Zdecydowałem się na prace z ugrupowaniem typu ‘trimethyl lock’ labilnym w środowisku aktywności esteraż. Wybór ten uzasadniony jest obecnością esteraż we wszystkich komórkach eukariotycznych, przez co hydroliza wiązań estrowego wyzwalająca późniejszy proces laktonizacji, powinna z łatwością przebiegać w cytoplazmie patogennych komórek grzybowych. Ponadto układ ‘trimethyl lock’ hydrolizowany przez esteraż ma najprostszą strukturę chemiczną



w stosunku do analogów rozpoznawanych przez fosfatazy i reduktazy, co wiąże się z potencjalnie najmniej skomplikowaną drogą syntezy.

Zdecydowałem, że syntezę koniugatów z łącznikiem tego typu należy przeprowadzić w zupełnie inny sposób niż do tej pory. W pierwszym etapie postanowiłem otrzymać łącznik, następnie dołączyć do niego cząsteczkę inhibitora enzymatycznego, a na końcu dobudować reszty parasoli. Synteza odpowiednio chronionego układu typu 'trimethyl lock' jest ośmioetpowa (Rysunek 50). Prace syntetyczne dotyczące każdego z etapów realizowałem w oparciu o różne źródła literaturowe, m. in. o prace Millera i Ji.^{140,141}



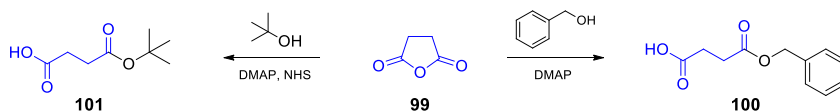
Rysunek 50. Ogólny schemat syntezy układu 'trimethyl lock' z chronionymi grupami karboksylowymi.

Aby można było wykorzystać do syntez łącznik omawianego typu, należy tak zaprojektować jego proces syntetyczny by jedna grupa estrowa była selektywnie usuwana w obecności drugiej. W chemii sideroforów zastosowano ester benzylowy chroniący grupę karboksylową pochodzącą od reszty kwasu bursztynowego ($R_1 = \text{CH}_2\text{Ph}$). Wolna grupa karboksylowa ($R_2 = \text{H}$) posłużyła natomiast jako miejsce uchwytu cząsteczki aktywnej.¹⁴⁰ Z uwagi na specyfikę cząsteczki inhibitora, który docelowo miałem przyłączyć, zaproponowałem inne podejście wymagające w swojej realizacji ochrony obydwu grup karboksylowych. Przeprowadziłem zatem syntezę dwóch wariantów łącznika typu 'trimethyl lock', w których grupy karboksylowe chronione były estrami: benzylowym i *tert*-butylowym ($R_1 = \text{CH}_2\text{Ph}$ i $R_2 = t\text{-Bu}$ oraz $R_1 = t\text{-Bu}$ i $R_2 = \text{CH}_2\text{Ph}$). W tym celu wykorzystałem jako substraty wyjściowe komercyjnie dostępne odczynniki: bezwodnik bursztynowy **99**, kwas 3-metylobut-2-enowy, 3,5-dimetylofenol **102** oraz inne reagenty nie wchodzące w strukturę chemiczną ostatecznej formy łącznika, takie jak: alkohol benzylowy czy alkohol *tert*-butylowy.

W pierwszym kroku otrzymałem wodorobursztyniany benzylu **100** oraz *tert*-butylu **101** na drodze alkoholizy bezwodnika bursztynowego **99** alkoholem benzylowym lub *tert*-butanolem (Rysunek 51). Wyizolowane i oczyszczone poprzez krystalizację monoestery



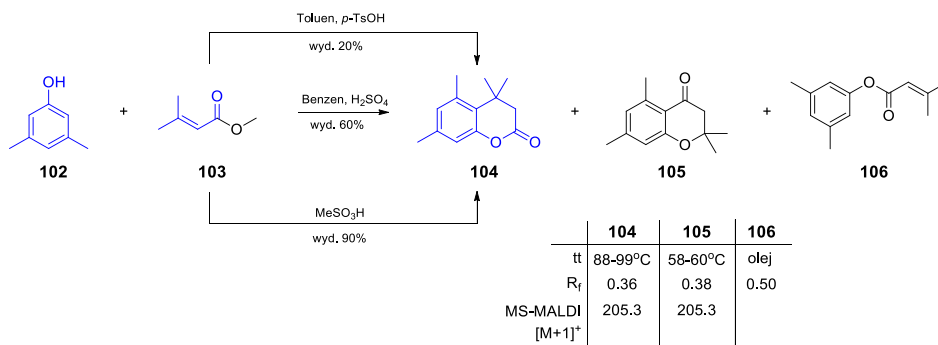
100 i **101** wykorzystałem w późniejszych reakcjach jako odczynniki acylujące grupę hydroksylową w 3,5-dimetylofenolu **102**.



Rysunek 51. Droga syntezy wodorobursztynianów benzylu **100** i *tert*-butylu **101**.

Równoległe przeprowadziłem reakcję estryfikacji kwasu 3-metylobut-2-enowego bezwodnym metanolem, katalizowaną kwasem siarkowym(VI), otrzymując z zadowalającą wydajnością 3-metylobut-2-enian metylu **103**, który oczyszczałem poprzez destylację próżniową.

Główny fragment układu ‘trimethyl lock’ zawierający trzy sąsiadujące ze sobą grupy metylowe otrzymuje się w wyniku kondensacji estru **103** oraz 3,5-dimetylofenolu **102**. Reakcja zachodzi nieselektywnie prowadząc do dwóch izomerycznych produktów: laktonu **104** i ketonu **105**. Ponadto towarzyszy jej reakcja transestryfikacji – powstaje ester **106**. Pożądanym produktem jest lakton **104**. Standardowo, zgodnie z literaturą,¹⁸¹ związek **104** otrzymuje się w reakcji kondensacji katalizowanej kwasem siarkowym(VI) prowadzonej w benzenie (Rysunek 52). Wydajność tej reakcji, według literatury¹⁸¹ wynosi niecałe 60%, co nie jest najlepszym wynikiem. Postanowiłem zmodyfikować procedurę stosując jako rozpuszczalnik toluen oraz kwas *p*-toluenosulfonowy jako kwasowy katalizator.



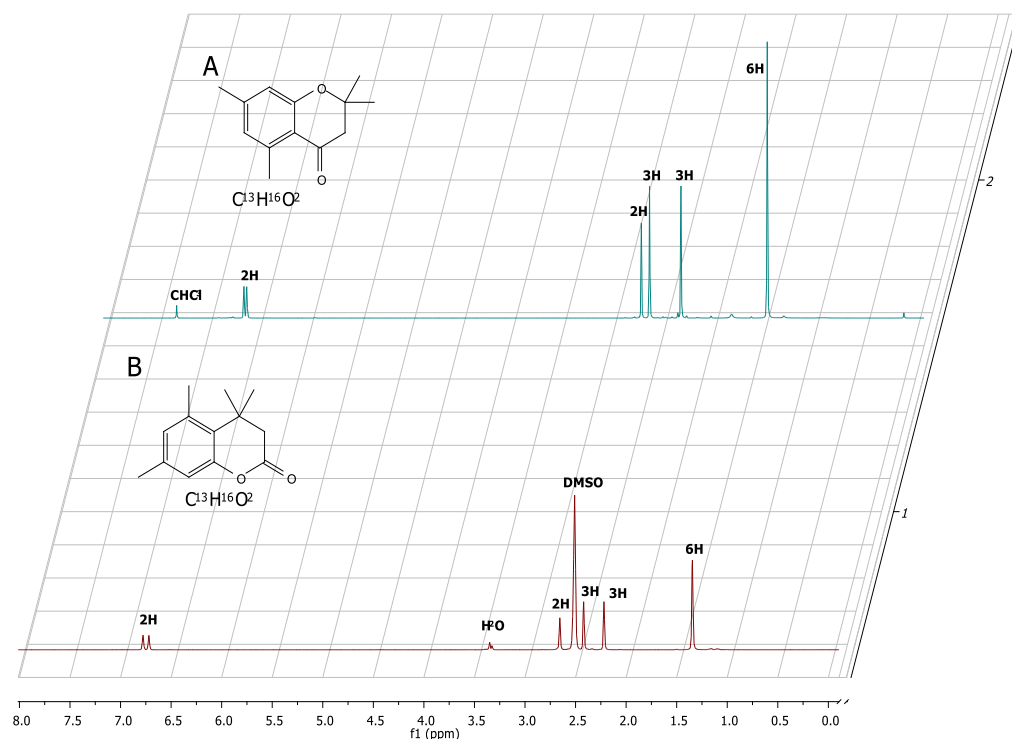
Rysunek 52. Droga syntezy laktonu **104** i ketonu **105**.

Po izolacji i oczyszczeniu na drodze krystalizacji, główny produkt reakcji (wydajność ponad 70%) poddałem standardowej identyfikacji przy pomocy spektroskopii ¹H NMR i spektrometrii mas. Pomimo zgodności widm ¹H NMR oraz MS produkt charakteryzował się dużo niższą temperaturą topnienia – różnica 30°C. Wyizolowałem pozostałe dwa główne produkty reakcji **105** i **106**, które oczyściłem, a następnie przeprowadziłem ich analizę strukturalną. Dokładna analiza spektralna trzech głównych produktów reakcji **104-106** oparta o widma ¹H NMR, ¹³C NMR, FTIR i MS-MALDI, a także chromatogramy TLC oraz pomiar temperatur topnienia produktów stałych, umożliwiła mi ustalenie struktur chemicznych wspomnianych związków. Okazuje się, że w zastosowanych warunkach reakcji głównym produktem jest aromatyczny keton **105** charakteryzujący się obecnością sygnału

przy 193 ppm na widmie ^{13}C NMR oraz pasmem drgań rozciągających układu karbonylowego $\nu_{\text{C=O}}$ przy 1680 cm^{-1} . Pożądany produkt **104**, powstający w tej reakcji z wydajnością rzędu 20% daje natomiast sygnał karbonylowego atomu węgla przy przesunięciu chemicznym około 170 ppm na widmie ^{13}C NMR oraz silne pasmo drgań rozciągających $\nu_{\text{C=O}}$ przy 1775 cm^{-1} .

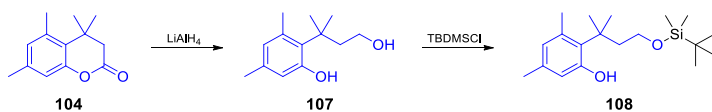
Podkreślić należy, że widma ^1H NMR pochodnych **104** i **105** są do siebie bardzo zbliżone i różnią się tylko w nieznacznym stopniu przesunięciami chemicznymi poszczególnych sygnałów (Rysunek 53). Ponadto, jako że związki **104** i **105** są izomerami, to również nie różniły się ich widma mas, wykonane techniką MS-MALDI.

Podsumowując, głównym produktem przeprowadzonej przeze mnie reakcji kondensacji estru **103** z 3,5-dimetylofenolem **102** był keton aromatyczny **105**, a pożądany produkt w postaci laktonu **104** powstawał z niezadowolającą wydajnością poniżej 20%.



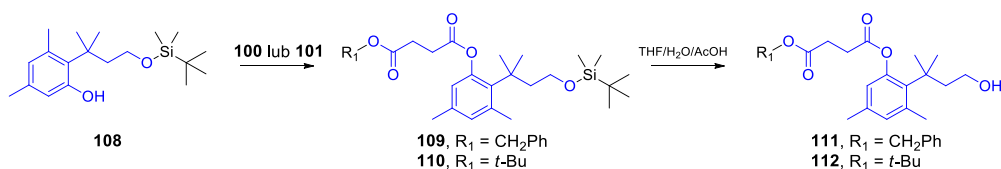
Rysunek 53. Widma ^1H NMR: (A) ketonu **105**; (B) pożadanego laktonu **104**.

Celem zwiększenia wydajności powstawania laktonu **104** kosztem ketonu aromatycznego **105** przeprowadziłem kondensację estru **103** i 3,5-dimetylofenolu **102** stosując jako rozpuszczalnik, a także kwasowy katalizator reakcji, kwas metanosulfonowy, tak jak sugerują Carpino i współpracownicy.¹⁸² Prowadząc reakcję w takich warunkach, ostatecznie otrzymałem lakton **104** z wysoką wydajnością rzędu 90%. W wyniku reakcji, późniejszej izolacji oraz oczyszczeniu produktu na drodze krystalizacji, otrzymałem czysty lakton **104**, który redukowałem glinowodorkiem litu. Jako produkt procesu redukcji, wyizolowany i oczyszczony na drodze krystalizacji, otrzymałem alkohol **107** (Rysunek 54).



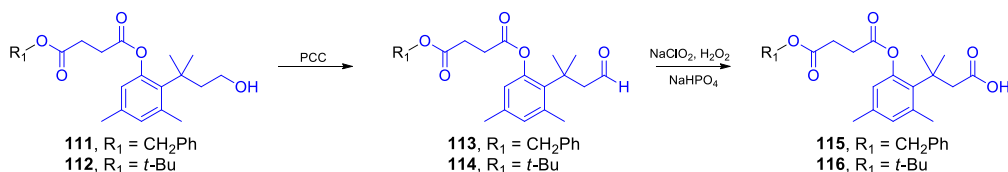
Rysunek 54. Droga syntezy pochodnej fenolu z selektywnie chronioną pierwszorzędową grupą hydroksylową.

W kolejnym kroku na pierwszorzędową grupę hydroksylową alkoholu **107** selektywnie wprowadziłem grupę ochronną w postaci eteru *tert*-butyldimetylosililowego, stosując jako odczynnik silylujący *tert*-butyldimetylochlorosilan (TBDMSCl). W wyniku przeprowadzonej reakcji otrzymałem ilościowo czysty produkt **108** (Rysunek 54), który poddałem następnie reakcji acylowania wolnej fenolowej grupy hydroksylowej, wodorobursztynianem benzylu **100** lub *tert*-butylu **101**. Reakcje przeprowadziłem stosując technikę DCC-DMAP otrzymując produkty **109** oraz **110**, które oczyściłem na drodze cieczowej chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. W otrzymanych estrach **109** oraz **110** przeprowadziłem w łagodnych warunkach, w obecności rozcieńczonego kwasu octowego, reakcję usuwania grupy silylowej, co w wyniku doprowadziło do otrzymania alkoholi pierwszorzędowych **111** oraz **112** (Rysunek 55).



Rysunek 55. Acylowanie fenolowej grupy hydroksylowej wodorobursztynianem benzylu i *tert*-butylu oraz deprotekcja grupy hydroksylowej.

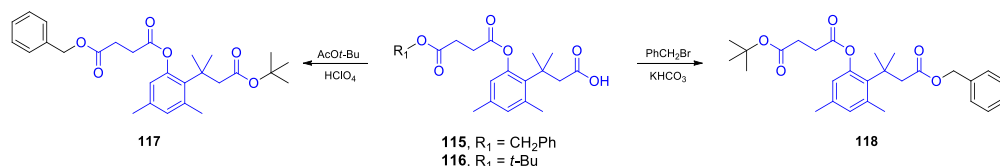
W następnym etapie alkohole **111** oraz **112** poddawałem reakcjom utleniania. Pierwsza z nich, to utlenianie alkoholu pierwszorzędowego do aldehydu **113** oraz **114** przy wykorzystaniu PCC jako utleniacza, natomiast kolejna to utlenianie aldehydu do kwasu karboksylowego **115** oraz **116** przy pomocy chloranu(VII) sodu jako utleniacza, generowanego *in situ* z chloranu(III) sodu i nadtlenku wodoru. Wszystkie produkty utleniania **113-116** oczyszczałem na drodze cieczowej chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Strukturę każdego produktu potwierdziłem poprzez badania spektroskopowe NMR i spektrometrię mas (Rysunek 56).



Rysunek 56. Utlenianie alkoholi pierwszorzędowych do odpowiednich kwasów karboksylowych.

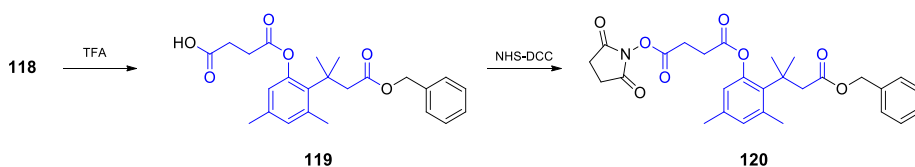
W kolejnym etapie należało wprowadzić na wolną grupę karboksylową w związku **115** i **116** takie ugrupowanie estrowe, aby można było selektywnie usunąć grupę ochronną w reszcie kwasu bursztynowego. W tym celu przeprowadziłem reakcję estryfikacji grupy

karboksylowej związku **115**, stosując jako reagent izobutylen generowany *in situ* z octanu *tert*-butylu w obecności stężonego kwasu nadchlorowego. W wyniku optymalizacji reakcji estryfikacji otrzymałem pożądany produkt **117**, przy czym wydajność estru *tert*-butylowego wyniosła około 30%; wielkość ta jest na tyle niska, że całkowicie zrezygnowałem z idei zastosowania tej grupy ochronnej. Równoległe przeprowadziłem reakcję estryfikacji pochodnej **116** do estru benzyłowego **118**, która przebiegła z zadowalającą wydajnością zwiększając tym samym całkowitą wydajność procesu otrzymywania chronionego układu ‘trimethyl lock’ (Rysunek 57).



Rysunek 57. Możliwe drogi estryfikacji układu ‘trimethyl lock’.

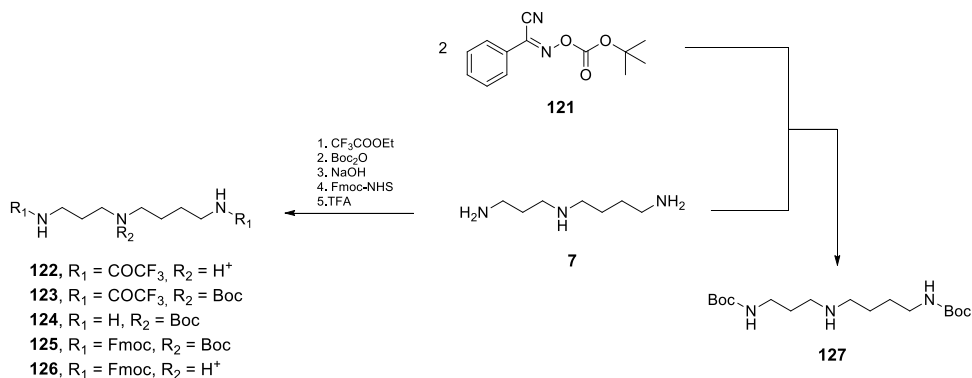
Prawidłowe funkcjonowanie łącznika ‘trimethyl lock’ uwarunkowane jest odpowiednim podłączeniem do jego struktury nanonośnika i cząsteczki transportowanej (Rysunek 49A). Istnieją dwie drogi postępowania prowadzące do otrzymania układu nanonośnik – łącznik – cząsteczka ładunku: (i) przyłączenie cząsteczki ‘ładunku’ do układu **118** w miejscu estru benzyłowego, po czym sprzężenie ze strukturą nanonośnika w miejscu estru *tert*-butylowego oraz (ii) początkowe sprzężenie z nanonośnikiem w miejscu estru *tert*-butylowego i późniejsze przyłączenie cząsteczki ‘ładunku’. Z racji faktu, że przyłączane przeze mnie cząsteczki są pochodnymi aminokwasowymi, posiadającymi wolne ugrupowania karboksylowe, które należałoby ochraniać, bardziej racjonalna wydawała mi się druga z wymienionych możliwości tworzenia wiązania amidowego z ‘trimethyl lock’. W tym celu przeprowadziłem reakcję deprotekcji ugrupowania karboksylowego chronionego estrem *tert*-butylowym działając na związek **118** kwasem trifluorooctowym. Otrzymany kwas **119** po oczyszczeniu na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, poddałem reakcji tworzenia estru NHS **120** z wykorzystaniem metody NHS – DCC, który bez dalszego oczyszczania posłużył jako substrat w kolejnym etapie syntezy (Rysunek 58).



Rysunek 58. Otrzymywanie estru aktywnego NHS układu ‘trimethyl lock’.

Tak jak wcześniej nadmieniałem, w tym przypadku syntezę parasola molekularnego przeprowadziłem w inny sposób aniżeli w przypadku pochodnych **8-13** i **18-19**. Zdecydowałem, że parasol zostanie nabudowany na gotowym układzie łącznik – cząsteczka transportowana – czyli układy steroidowe przyłączyłem do konstruowanej struktury koniugatu jako ostatnie. Decyzję o takiej drodze syntezy uzasadniam mniejszą ilością

możliwych reakcji ubocznych w porównaniu do tych jakie mogłyby zajść podczas przyłączania estru aktywnego TDBTU-FMDP do pełnej struktury nanoonośnika. Należało więc utworzyć wiązanie amidowe pomiędzy pochodną **120** a drugorzędową grupą aminową spermidyny **7**. Z racji obecności jeszcze dwóch innych pierwszorzędowych grup aminowych w cząsteczce spermidyny, należało otrzymać pochodną z chronionymi grupami pierwszorzędowymi oraz wolną grupą drugorzędową. Postanowiłem przebadać użyteczność do tego celu, zarówno ochrony Fmoc, jak i Boc. W tym celu opierając się o prace Ilies¹⁸³ przeprowadziłem syntezę Fmoc-pochodnej **126** (Rysunek 59).



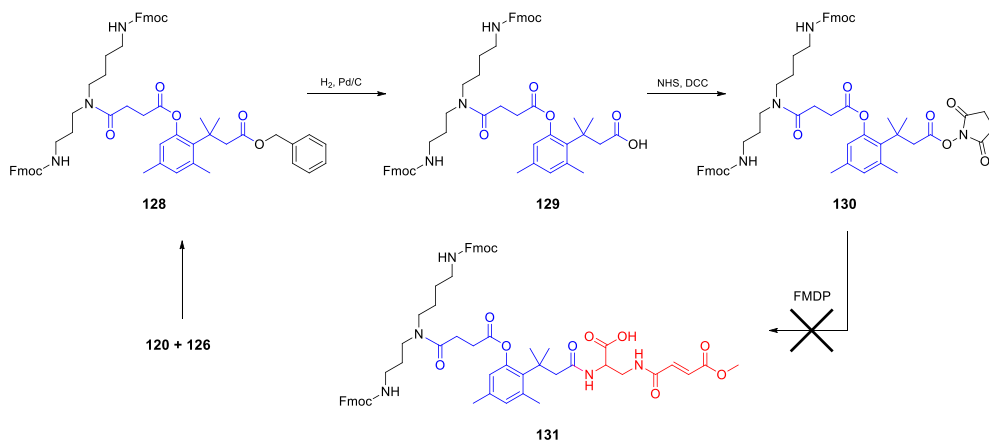
Rysunek 59. Droga syntezy pochodnych spermidyny chronionych na terminalnych grupach aminowych ugrupowaniami Fmoc **126** i Boc **127**.

Jako wyjściowy substrat wykorzystałem komercyjnie dostępną spermidynę **7**, którą w pierwszym etapie poddałem reakcji selektywnego acylowania trifluoroocetanem etylu z udziałem pierwszorzędowych grup aminowych. W wyniku izolacji i oczyszczania na drodze krystalizacji otrzymałem czystą chromatograficznie pochodną **122**, która została następnie przekształcona w Boc-chronioną pochodną **123**. Jako czynnik wprowadzający ugrupowanie Boc na drugorzędową grupę aminową spermidyny zastosowałem pirowęglań di-*tert*-butylu. Związek **123** oczyściłem na drodze krystalizacji, po czym poddałem go procesowi usuwania grup ochronnych z pierwszorzędowych funkcji aminowych. W tym celu przeprowadziłem reakcję hydrolizy z katalizą zasadową (0,1 M wodorotlenek sodu) otrzymując czystą pochodną **124**. Wolne pierwszorzędowe grupy aminowe ochroniłem następnie ugrupowaniami Fmoc, stosując jako odczynnik protekcyjny ester NHS-Fmoc i otrzymując jako produkt pochodną **125**, która oczyszczona została na drodze chromatografii kolumnowej. Ostatnim etapem prowadzącym do otrzymania zamierzonego związku było usunięcie ugrupowania Boc, które przeprowadziłem stosując TFA jako czynnik deprotekcyjny. Otrzymana pochodna **126** posłużyła następnie jako substrat w reakcji sprzęgania z układem **120**.

Reakcje tworzenia wiązania amidowego pochodnej spermidyny **126** z układem 'trimethyl lock' **120** oraz późniejsza izolacja i oczyszczanie na drodze chromatografii kolumnowej doprowadziły mnie do otrzymania zamierzonego połączenia łącznika ze strukturą przyszłego parasola molekularnego **128** (Rysunek 60). Hydrogenoliza ugrupowania benzyłowego w związku **128**, a następnie przekształcenie wolnej grupy karboksylowej



w ester aktywny **130** umożliwiło mi przeprowadzenie reakcji sprzęgania z cząsteczką FMDP. Monitorowanie postępu reakcji wykazało, że wolna grupa aminowa FMDP powoduje usuwanie osłon układu **130**, uwalniając tym samym kolejne pierwszorzędowe ugrupowania aminowe. Skutkiem tego z mieszaniny poreakcyjnej nie wyizolowałem zamierzonego produktu **131**. W wyniku przeprowadzonych reakcji okazało się, że sprzęganie FMDP ze strukturą Fmoc-chronionego układu **130** jest niemożliwe do przeprowadzenia w zastosowanych warunkach (Rysunek 60).



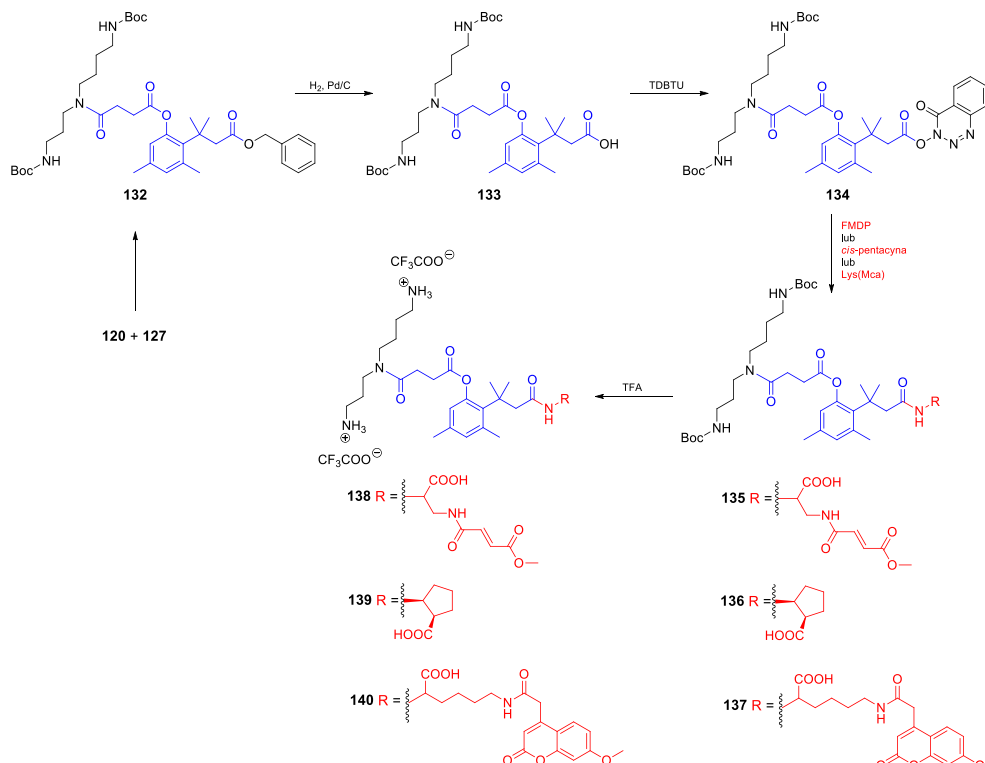
Rysunek 60. Propozycja drogi syntezy połączenia FMDP z układem ‘trimethyl lock’ z wykorzystaniem ugrupowania Fmoc jako ochrony pierwszorzędowych grup aminowych spermidyny.

Ponadto podjąłem próbę deprotekcji pochodnej **128** za pomocą piperydyny, aby wymienić ugrupowania Fmoc na Boc. Analiza TLC wykazała przy tym, że układ poddawany tej reakcji ulega daleko posuniętej lizie. Przyczyną tego stanu jest najprawdopodobniej aminoliza wiązań estrowych układu ‘trimethyl lock’. Wyniki opisanych badań skłoniły mnie do sformułowania wniosku, że reakcja sprzęgania FMDP z układem ‘trimethyl lock’ nie może przebiegać w obecności ugrupowań Fmoc, a po drugie usuwanie ochron pierwszorzędowych grup aminowych spermidyny nie może zachodzić w środowisku aminowym – czy drugorzędowym.

W tej sytuacji przeprowadziłem badania nad przydatnością do syntezy końcowych koniugatów drugiej opcji czyli N^1, N^7 -di-*tert*-butoksykarbonylospemidyny **127**. Wydajna i selektywna ochrona pierwszorzędowych grup aminowych spermidyny z wykorzystaniem powszechnie stosowanych odczynników, takich jak pirowęglan di-*tert*-butylu czy chloromrówczan *tert*-butylu, wymaga wcześniejszej selektywnej ochrony grupy drugorzędowej. Analiza danych literaturowych doprowadziła mnie do 2-[(*tert*-butoksykarbonylo)oksymino]-2-fenylacetonytrylu (Boc-ON) **121**, który stosowany równomolowo względem pierwszorzędowych grup aminowych powoduje ich selektywną ochronę (Rysunek 59). Bazując na danych literaturowych¹⁸³ przeprowadziłem syntezę pochodnej **127**, którą wykorzystałem w reakcji sprzęgania ze związkiem **120** analogicznie jak w przypadku pochodnej **128**. Otrzymany produkt **132** poddałem następnie reakcji hydrogenolizy otrzymując związek **133**. Celem utworzenia wiązania amidowego z cząsteczką FMDP, zrezygnowałem z estrów NHS na rzecz estrów TDBTU, charakteryzujących się



większą reaktywnością. Ester aktywny **134**, generowany *in situ*, poddałem kondensacji z cząsteczką FMDP. W wyniku przeprowadzonej reakcji otrzymałem surowy koniugat **135**, którego nie udało mi się dokładnie oczyścić na drodze chromatografii kolumnowej. Związek **135** poddałem następnie procesowi deprotekcji w środowisku kwasu trifluorooctowego, co skutkowało powstaniem pochodnej **138** (Rysunek 61), którą po izolacji z mieszaniny reakcyjnej, bez dokładnego oczyszczania poddałem reakcji sprzęgania z estrem TDBTU **141** kwasu deoksycholowego.

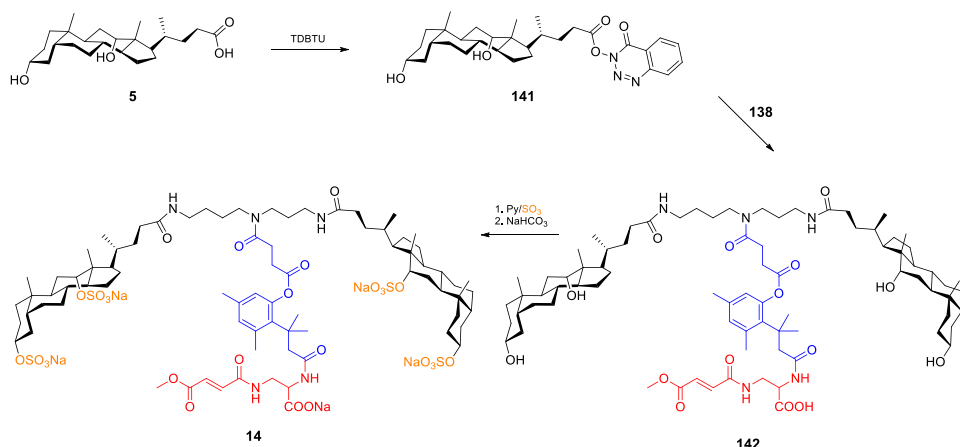


Rysunek 61. Droga syntezy połączenia FMDP i *cis*-pentacycyny z układem 'trimethyl lock' z wykorzystaniem ugrupowania Boc jako ochrony pierwszorzędowych grup aminowych spermidyny.

Tworzenie wiązania amidowego pomiędzy grupami aminowymi spermidyny w związku **138** i ugrupowaniami karboksylowymi kwasu deoksycholowego **5** przeprowadziłem z wykorzystaniem techniki estrów aktywnych TDBTU kwasu żółciowego. W tym celu aktywowałem grupę karboksylową kwasu deoksycholowego **5** z wykorzystaniem TDBTU otrzymując pochodną **141**. Generowany *in situ* ester **141** poddałem reakcji sprzęgania z wcześniej otrzymaną pochodną **138**. Izolacja produktu reakcji oraz jego późniejsze oczyszczenie na drodze chromatografii kolumnowej prowadziło do otrzymania koniugatu **142** parasola molekularnego z cząsteczką FMDP. Ostatnim etapem zamierzonej drogi był proces estryfikacji ugrupowań hydroksylowych reszt steroidowych z wykorzystaniem kompleksu Py/SO₃ oraz następującą po niej alkalizacją układu reakcyjnego, co prowadziło do ostatecznego produktu **14** (Rysunek 62). Okazało się jednak, że ostatnia ze wspomnianych reakcji nie zachodzi z zadowalającą wydajnością, a ilość

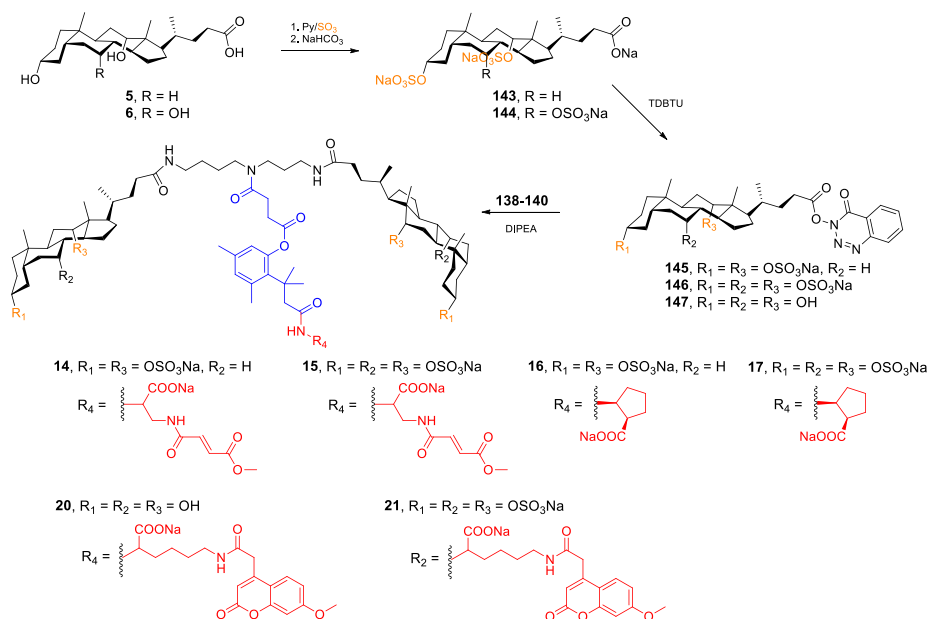


polarnych produktów ubocznych sprawia, że oczyszczanie produktu **14** na drodze chromatografii kolumnowej jest niezwykle uciążliwe.



Rysunek 62. Tworzenie wiązania amidowego między resztami kwasu deoksycholowego a pierwszorzędowymi grupami aminowymi spermidyny.

Celem uniknięcia niedogodności wynikającej z problematycznego procesu oczyszczania produktu **14** na drodze chromatografii kolumnowej, postanowiłem zmienić kolejność etapów we wcześniej założonej drodze syntezy. Modyfikacja polegała na uprzedniej estryfikacji kwasu żółciowego **5** lub **6** do pochodnej **143** lub **144**, późniejszym generowaniu *in situ* estru aktywnego TDBTU **145** lub **146** i w ostatecznym kroku tworzeniu wiązań amidowych z aminowymi resztami spermidyny związku **138** (Rysunek 63).



Rysunek 63. Sprzężanie układu 'trimethyl lock' z resztami kwasów żółciowych.

Opisana zmiana strategii przyniosła oczekiwane rezultaty. Po pierwsze w czasie reakcji nie powstaje tak duża ilość polarnych produktów ubocznych, a ponadto proces oczyszczania produktów **14** i **15** stał się zdecydowanie mniej problematyczny.

Opracowaną metodę syntezy koniugatu **14** i **15** wykorzystałem do otrzymania pozostałych połączeń parasoli molekularnych z substancjami aktywnymi, w tym pochodnych **16** i **17**, w których cząsteczką biologicznie aktywną jest inhibitor enzymatyczny – *cis*-pentacyna **2**. Otrzymałem także pochodne fluorescencyjne **20** i **21**, w których cząsteczką transportowaną jest Lys(Mca) **4**. Struktury otrzymanych pochodnych **14-17** oraz **20-21** potwierdzone zostały na podstawie widm ^1H NMR i ^{13}C NMR oraz spektrometrią mas.

5.5. Badania biologiczne

Ocena biologiczna otrzymanych połączeń parasoli molekularnych z cząsteczkami aktywnymi FMDP i *cis*-pentacyną, przeprowadzona została w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej przez mgr inż. Dorotę Martynow. Badaniom poddane zostały pochodne **10-17**, posiadające w swojej strukturze potencjalnie labilne łączniki, których czystość wyznaczoną na podstawie chromatogramów HPLC przedstawiłem w Tabeli 3.

Tabela 3. Czystość docelowych pochodnych **10-17**, wyznaczona za pomocą chromatogramów HPLC.

	10	11	12	13	14	15	16	17
Czystość, HPLC	75.6%*	97.1%	90.9%	94.0%	99.4%	96.2%	91.2%	92.8%

*niska czystość spowodowana trudnościami w procesie oczyszczania na drodze chromatografii kolumnowej

Ewaluacja biologiczna przeprowadzona na liniach komórkowych patogennych grzybów: *Candida albicans* SC 5314, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* oraz *Candida krusei*, wykazała że otrzymane połączenia parasoli molekularnych z FMDP i *cis*-pentacyną nie wykazują zadowalającej aktywności biologicznej. W Tabeli 4 zestawiono wartości MIC₅₀ dla otrzymanych pochodnych **8-17** i **20-21**.

Tabela 4. Wartości MIC₅₀ [µg/mL] pochodnych **8-17**. Pomiar przeprowadzone w pożywce YNB-SA.

Pochodna	<i>C. albicans</i> SC 5314	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. krusei</i> DSM 6128	<i>C. glabrata</i> DSM 11226
8	-	>128	-	-
9	-	32	-	-
10	838	607	>>1024	>>1024
11	>>1024	>>1024	>>1024	>>1024
12	492	458	>>1024	>>1024
13	>>1024	>>1024	>>1024	>>1024
14	796	781	>>1024	>>1024
15	>>1024	>>1024	>>1024	>>1024
16	659	895	>>1024	>>1024
17	612	561	>>1024	>>1024
20	>>1024	>>1024	>>1024	>>1024
21	611	557	>>1024	>>1024

Hamowanie wzrostu komórek *C. albicans* w bardzo wysokich stężeniach stwierdzono jedynie dla związków **8, 9, 10, 12, 14, 16, 17** i **21**. Dla związków **8, 9, 10, 12** i **14**,



zawierających w swojej strukturze FMDP, stwierdzono ponadto, że obserwowane hamowanie wzrostu *C. albicans* ma miejsce także, gdy pożywka zawiera w swoim składzie *N*-acetylo-D-glukozaminę w stężeniu 10 mM. Fakt ten wskazuje, że obserwowane hamowanie wzrostu *C. albicans* nie jest konsekwencją działania FMDP jako inhibitora syntazy GlcN-6-P, lecz wynika z innych przyczyn. Jest wielce prawdopodobne, że także hamowanie wzrostu *C. albicans* przez związki **16**, **17** i **21** nie wynika z działania cis-pentacyny (w **16** i **17**) ani pochodnej lizyny (w **21**).

Braku znaczącej aktywności przeciwgrzybowej otrzymanych połączeń upatrywać należy najprawdopodobniej w: (i) braku transportu w poprzek błony biologicznej patogennych komórek grzybowych lub (ii) niemożności lizy wiązania estrowego i amidowego układu 'trimethyl lock' i łącznika aminokwasowego przez komórkowe esterazy i amidazy. W celu odpowiedzi na postawione tezy, grupa badawcza Katedry Technologii Leków i Biochemii przeprowadziła badania mikroskopowe z wykorzystaniem fluorescencyjnych pochodnych **20** i **21**. Przeprowadzone oznaczenia ujawniły, że pochodna **21** wnika do komórek *C. albicans*, natomiast pochodna **20** nie wnika. Oznacza to, że niewielka aktywność pochodnych **8** i **9** może być spowodowana słabym wnikaniem koniugatów do komórek, natomiast brak aktywności lub słaba aktywność pozostałych pochodnych może być spowodowana brakiem hydrolizy wewnątrzkomórkowej. Przypuszczenia te wymagają jednak potwierdzenia eksperymentalnego.

Ewaluacji biologicznej poddane zostały także koniugaty parasoli molekularnych z makrolidami polienowymi **68-79**. Dla wszystkich związków wyznaczono wartości minimalnych stężeń powodujących zahamowanie wzrostu *C. albicans* w 80% w stosunku do kontroli (MIC₈₀). Wyniki przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Wartości MIC₈₀ [µg/mL] amfoterycyny B, nystatyny i koniugatów **68-79** wobec *Candida albicans* SC 5314. Pomiary wykonano w pożywce RPMI-1640.

Pochodna	AmB	68	69	70	71	72	73	Nys	74	75	76	77	78	79
MIC ₈₀	0.3	7.1	1.8	5.5	0.9	1.0	0.6	0.8	18	14	33	38	45	127

Wszystkie koniugaty parasoli molekularnych z nystatyną (**74-79**) wykazywały aktywność znacząco niższą niż sam antybiotyk. Aktywność niższą od wyjściowego antybiotyku stwierdzono także dla koniugatów amfoterycyny B (**68-73**), jednakże w przypadku koniugatów **71-73** było to zmniejszenie bardzo nieznaczne.

W Tabeli 6 przedstawiono wartości MIC₅₀, MIC₈₀ i MIC₉₀ wyznaczone dla pochodnych **71**, **73**, **75**, wykazujących najlepszą w porównaniu do amfoterycyny B lub nystatyny aktywność przeciwgrzybową.

Tabela 6. Wartości MIC₉₀, MIC₈₀ i MIC₅₀ [µg/mL] pochodnych **71**, **73**, **75**. Pomiary wykonano w pożywce RPMI.

Szczep	MIC ₉₀			MIC ₈₀			MIC ₅₀		
	71	73	75	71	73	75	71	73	75
<i>C. albicans</i> ATCC	1.2	1	30	0.8	0.5	15	0.7	0.26	12
<i>C. albicans</i> B3	1	1	33	0.92	0.75	15	0.8	0.4	13
<i>C. albicans</i> B4	4	2	>>256	3.6	1.6	15	2.3	1.3	10
<i>S. cerevisiae</i>	1	1	4	0.95	0.8	3.8	0.75	0.6	3
<i>C. glabrata</i>	3.8	1.8	>>256	3.6	1.7	256	2.7	1.3	164
<i>C. krusei</i>	4	2	>>256	3.75	1.8	31	3	1.5	17



<i>C. parapsilosis</i>	>>256	>>256	>>256	>>256	>>256	>>256	0.7	1.7	>>256
<i>C. albicans</i> SC	1	0.9	15.7	0.93	0.6	14	0.95	0.4	10
<i>C. tropicalis</i>	>>256	>>256	>>256	16	32	4	12.5	24	3.4

Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że najwyższą aktywnością przeciwgrzybową charakteryzują się w przypadku pochodnych amfoterycyny B związki zawierające 8 atomów węgla w łańcuchu ω -aminoacylowym, natomiast w przypadku połączeń z nystatyną A₁ najlepsze wyniki otrzymano dla pochodnej **75**, zawierającej w swojej strukturze parasol deoksycholowy z czterowęglowym łańcuchem ω -aminoacylowym.

Dokonano także oznaczeń hemotoksyczności otrzymanych koniugatów wobec erytrocytów ludzkich. Wyznaczano wartości parametru EH₅₀, czyli stężenia związku powodującego lizę 50% erytrocytów znajdujących się w próbce. Nie badano pochodnej **79** wykazującej bardzo niską aktywność przeciwgrzybową. Wyniki przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Wartości EH₅₀ [μg/mL] amfoterycyny B, nystatyny oraz pochodnych **68-78**, wyznaczone wobec erytrocytów ludzkich.

Pochodna	AmB	68	69	70	71	72	73	Nys	74	75	76	77	78
EH ₅₀	4.0	8.5	12	15	31	42	64	41	6.5	5.0	24	37	47

Zgodnie z danymi zamieszczonymi w Tabeli 7 koniugaty parasoli molekularnych z cząsteczką amfoterycyny B wykazują niższą od wyjściowego antybiotyku aktywność hemolityczną, natomiast w przypadku koniugatów nystatyny, aktywność ta była wyższa, jedynie dla pochodnych **77** i **78** była ona zbliżona do aktywności samej nystatyny.

ROZDZIAŁ 6

6. Podsumowanie i wnioski końcowe

Celem badań, których wyniki opisano w niniejszej rozprawie doktorskiej było zaprojektowanie oraz opracowanie metody syntezy połączeń parasoli molekularnych ze związkami o udowodnionej aktywności przeciwgrzybiczej. Tworzenie tych połączeń miało na celu usprawnienie transportu substancji aktywnych w poprzek błony biologicznej patogennych komórek grzybowych. Łącznie zaprojektowałem i otrzymałem czternaście związków docelowych, z czego osiem to pochodne zawierające w swojej konstytucji cząsteczkę FMDP, dwie zawierające cząsteczkę *cis*-pentacyny oraz cztery pochodne fluorescencyjne stanowiące połączenia z dansyloglicyną oraz Lys(Mca). Wszystkie otrzymane koniugaty to związki nowe nieopisane w literaturze. Otrzymane pochodne przekazane zostały do badań biologicznych mających na celu określenie ich aktywności przeciwgrzybowej oraz zdolności do przenikania przez błonę komórkową patogennych komórek grzybowych.

Podsumowując, na podstawie prac badawczych zrealizowanych w ramach rozprawy doktorskiej można sformułować następujące wnioski:

- I. Struktury parasolowe, zawierające w swojej konstytucji polarne cząsteczki ładunków o charakterze aminokwasowym można otrzymać na drodze dwóch alternatywnych podejść syntetycznych. Pierwsze z nich polega na początkowej syntezie struktury nanonośnika i późniejszym sprzęganiu z cząsteczką transportowaną. Natomiast drugie podejście opiera się o ideę tworzenia połączenia łącznik-cząsteczka transportowana, z późniejszym nadbudowywaniem struktury nanonośnika. Podkreślić należy, że drugie ze wspomnianych podejść syntetycznych daje na ogół mniej produktów ubocznych, co przekłada się na lepsze wydajności.
- II. Tworzenie wiązań amidowych parasoli molekularnych i ich połączeń z aminokwasowymi cząsteczkami transportowanymi, przeprowadzić można z wykorzystaniem techniki estrów aktywnych DCC-NHS lub TDBTU. Łatwiejszą w przeprowadzeniu i dającą lepsze rezultaty jest metoda z wykorzystaniem TDBTU jako czynnika kondensującego, szczególnie w przypadku pochodnych FMDP.
- III. W przypadku pochodnych zestryfikowanych trójtlenkiem siarki, możliwe jest otrzymanie struktur parasolowych na drodze bezpośredniej kondensacji



pochodnych spermidyny z estrami TDBTU *O,O'*-bis(siarczano)deoksycholanu trisodowego lub *O,O',O''*-tris(siarczano)cholanu tetrasodowego. Takie podejście syntetyczne nie zostało, jak do tej pory, opisane w literaturze.

- IV. Możliwe jest zastosowanie peptydowego łącznika bazującego na strukturze L-alaniny i ω -aminokwasów w syntezie koniugatów parasoli molekularnych z cząsteczką FMDP.
- V. Możliwe jest zastosowanie idei łącznika 'trimethyl lock' w syntezie połączeń z parasolami molekularnymi. W przypadku pochodnych zawierających układ 'trimethyl lock' najbardziej wydajną, choć trudną na etapie izolacji produktu okazała się metoda, w której układy steroidowe przyłączane są w ostatnim etapie z wykorzystaniem TDBTU jako środka kondensującego.
- VI. Otrzymany układ 'trimethyl lock', chroniony estrem *tert*-butylowym i benzylovym, nieopisany w literaturze – stanowi dogodny substrat w syntezie połączeń nanonośnik – 'trimethyl lock' – cząsteczka transportowana.
- VII. Nie udało się zastosować idei łącznika *o*-ditiobenzoilokarbamoilowego w syntezie połączeń parasoli molekularnych z cząsteczkami transportowanymi. Pochodne DSC nie są na tyle reaktywne aby utworzyć wiązanie amidowe z cząsteczką FMDP.

Otrzymane pochodne zostały poddane badaniom biologicznym, wykonanym przez dr inż. Martę Schielmann oraz mgr inż. Dorotę Martynow z Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej. Badania ukierunkowane na ewaluację aktywności biologicznej pochodnych **8-17** oraz mikroskopowe oznaczenia akumulacji fluorescencyjnych pochodnych **20** i **21** w komórkach grzybowych, pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- I. Otrzymane pochodne **8-17** nie wykazują znaczącej aktywności biologicznej. W przypadku pochodnych **8** i **9**, stanowiących bezpośrednie połączenia MU z cząsteczką FMDP, zaobserwowano pewną aktywność, która wynika najprawdopodobniej z faktu akumulowania się układów steroidowych w biwarstwie lipidowej patogennych komórek grzybowych. Podobną aktywność obserwuje się w przypadku pochodnych **30** i **31**, nie zawierających żadnej cząsteczki ładunku.
- II. Pochodne **10-17**, zawierające w swojej konstytucji potencjalnie labilne łączniki, wykazują bardzo niewielką aktywność przeciwgrzybową lub nie wykazują żadnej aktywności biologicznej. Prawdopodobną przyczyną jest brak penetracji do komórek lub hydrolizy wewnątrzkomórkowej.
- III. Badania przeprowadzone na fluorescencyjnych pochodnych **20** i **21** dowodzą, że pochodna **21** wykazuje zdolność do penetracji grzybowej błony biologicznej.
- IV. Należy dokonać kolejnych badań, ukierunkowanych na określenie zdolności komórkowych esteraz i amidaz do lizy pożądanego wiązania amidowego i estrowego w zastosowanych łącznikach. Jeżeli okaże się, że wspomniane enzymy nie są zdolne do katalizowania lizy odpowiednich wiązań, należy rozważyć przeprowadzenie modyfikacji strukturalnych koniugatów, celem polepszenia ich właściwości.



- V. W podsumowaniu wyników badań aktywności biologicznej koniugatów parasoli molekularnych z makrolidami polienowymi można stwierdzić, że pochodne amfoterycyny B wykazują lepszą selektywną toksyczność (rozumianą jako stosunek wartości parametru charakteryzującego aktywność przeciwgrzybową, czyli MIC do wartości parametru charakteryzującego hemotoksyczność - EH) od macierzystego antybiotyku (w przypadku pochodnej **73** wyniki te potwierdzają dane przedstawione w pracy Janouta i współpracowników¹⁷²). Natomiast pochodne nystatyny wykazują gorszą selektywną toksyczność niż sama nystatyna.

ROZDZIAŁ 7

7. Część eksperymentalna

7.1. Aparatura

Magnetyczny rezonans jądrowy. Struktury otrzymanych związków potwierdzono w oparciu o widma ^1H i ^{13}C NMR, które zostały wykonane w Międzyuczelnianym Laboratorium NMR Politechniki Gdańskiej, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku, przy użyciu spektrometru Unity 500 plus firmy Varian (500 MHz) oraz w Katedrze Chemii Nieorganicznej Politechniki Gdańskiej przy użyciu spektrometru Bruker Avance III HD 400 MHz.

Spektrometria mas. Analizę HRMS-ESI przeprowadzono na aparacie Agilent Technologies 6540 UHD Accurate – Mass Q-TOF LC/MS w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej. Analizę MS-MALDI przeprowadzono na aparacie MALDI-TOF firmy BIFLEX III z wykorzystaniem matryc DHB lub CCA w Zespole Pracowni Fizyko-Chemicznych Uniwersytetu Gdańskiego.

Spektroskopia w podczerwieni. Widma w podczerwieni wykonano w Katedrze Chemii Nieorganicznej Politechniki Gdańskiej przy użyciu aparatu Nicolet i S50 FT-IR.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa. Analizę HPLC wykonano z wykorzystaniem kolumny Poroshell EC-C18 (3.0×150 mm), 2.7 μm firmy Agilent Technologies. Temperatura pomiaru wynosiła 40°C; objętość nastrzykowa 2 μL ; prędkość przepływu 0.4 mL/min. Jako eluent zastosowano 0.1% kwas mrówkowy w wodzie oraz 0.1% kwas mrówkowy w mieszaninie acetonitryl/woda (1/1, v/v). Zastosowano detektor UV-Vis o długościach fali: $\lambda=382$ nm i $\lambda=580$ nm.

Płytki TLC i żel krzemionkowy. Do chromatografii TLC zastosowano płytki TLC Silica gel 60 F254 firmy Merck. Do chromatografii kolumnowej zastosowano żel krzemionkowy Geduran®Si 60 (40-63 μm) firmy Merck.

Kriometr. Do pomiarów temperatury topnienia ciał stałych wykorzystano technikę otwartej kapilary. Pomierzone temperatury topnienia otrzymanych związków nie były korygowane.

Lampa UV. Do detekcji płytek TLC zastosowano lampę UV Benda Typ Nu-4 KL o długości fali $\lambda=254$ nm oraz $\lambda=366$ nm.

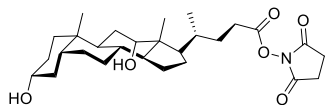
Wywoływacze płytek TLC. Jako wywoływacze płytek TLC zastosowano ninhydrynę oraz wywoływacze: molibdenowo-cerowy i anizowy.

Reagenty i rozpuszczalniki. Reagenty i rozpuszczalniki pochodziły ze źródeł komercyjnych firm Merck, SigmaAldrich oraz POCH.

7.2. Opis syntezy

7.2.1. Synteza parasoli molekularnych

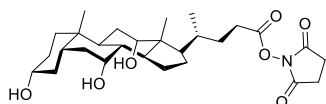
Deoksycholan *N*-hydroksysukcynimidylu **28**



W kolbie kulistej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, wkraplacz i termometr, umieszczono 15 g (40 mmol) kwasu deoksycholowego **5** oraz 4.6 g (40 mmol) NHS, które rozpuszczono w 250 mL bezwodnego tetrahydrofuranu.

Do otrzymanej homogennej mieszaniny wdroplono 8.3 g (40 mmol) DCC rozpuszczonego w 30 mL bezwodnego tetrahydrofuranu, utrzymując temperaturę mieszaniny reakcyjnej 10-15°C. Po wdropleniu całej objętości roztworu DCC mieszaninę pozostawiono, stale mieszając, w temperaturze pokojowej na 36h. Po tym czasie odsączono wytrącony osad DCU, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 300 mL chloroformu i przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x200 mL), a następnie wodą (2x200 mL). Frakcję organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość krystalizowano z octanu etylu. Otrzymano 13.2 g (27 mmol, 67%) produktu **28** w postaci białego ciała stałego o *t*_m 155-157°C i *R*_f 0.50 (CHCl₃/MeOH, 9/0.5, v/v).

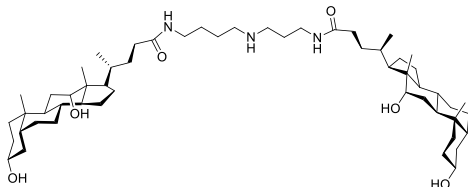
Cholan *N*-hydroksysukcynimidylu **29**



Ester aktywny **29** otrzymano analogicznie do związku **28**. Wychodząc z 15 g (40 mmol) kwasu cholowego **6**, otrzymano 10.61 g (21 mmol, 57%) produktu w postaci białej szklistej piany o *t*_m 85-90°C (lit.¹⁷⁵ 119-120°C) i *R*_f 0.30

(CHCl₃/MeOH, 9/0.5, v/v).

*N*¹,*N*⁷-di-deoksycholilospermidyna **30**



W kolbie kulistej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i wkraplacz, umieszczono 9 g (18 mmol) estru aktywnego kwasu deoksycholowego **28**, który rozpuszczono w 200 mL chloroformu. Następnie chłodząc w łaźni lodowej, wdroplono 1.3 g (9 mmol)

spermidyny **7** rozpuszczonej w 10 mL chloroformu. Mieszanie kontynuowano w łaźni chłodzącej przez 1h, a następnie stale mieszając pozostawiono w temperaturze pokojowej na 48h. Mieszaninę reakcyjną zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, a surowy produkt w postaci szklistej piany oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników

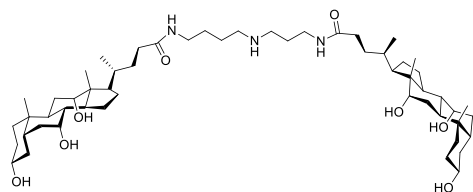


$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (4/1.5/0.1, v/v/v). Otrzymano 5.17 g (5.8 mmol, 64%) produktu **30** w postaci białego ciała stałego o t_f 100-105°C i R_f 0.31 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 4/1.5/0.1, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{55}\text{H}_{95}\text{N}_3\text{O}_6$: 893.7221; znalezione 894.7290 $[\text{M}+1]^+$.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 3.95 (s, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.24 (t, 2H), 3.18 (t, 2H), 2.69 (t, 4H), 2.24 (m, 2H), 2.11 (m, 2H), 1.97-1.70 (m, 16H), 1.68-1.22 (m, 32H), 1.23-1.05 (m, 4H), 1.03-0.86 (m, 14H), 0.70 (s, 6H).

N^1, N^7 -di-choloilospermidyna **31**



Pochodną **31** otrzymano analogicznie jak związek **30**. Wychodząc z 10 g (20 mmol) estru aktywnego kwasu cholowego **29** i 1.46 g (10 mmol) spermidyny **7** otrzymano 5.48 g (0.6 mmol, 60%) produktu w postaci białego ciała stałego o t_f 160-170°C (lit.¹⁷⁴ 164-166°C)

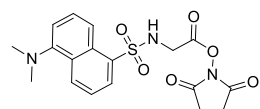
i R_f 0.50 ($\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 4/0.1, v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{55}\text{H}_{95}\text{N}_3\text{O}_8$ 925.7197; znalezione 926.7199 $[\text{M}+1]^+$.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 3.94 (s, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.37 (m, 2H), 3.24 (t, 2H), 3.18 (t, 2H), 2.73 (t, 4H), 2.27 (m, 6H), 2.12 (m, 2H), 2.03-1.71 (m, 16H), 1.69-1.49 (m, 16H), 1.47-1.23 (m, 10H), 1.10 (m, 2H), 1.08-0.95 (m, 8H), 0.92 (s, 6H), 0.70 (s, 6H).

7.2.2. Synteza bezpośrednich połączeń parasoli molekularnych z dasyloglicyną i FMDP

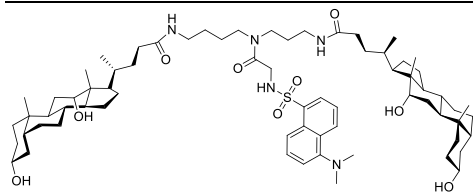
N -dasyloglicynian N -hydroksysukcynimidylu **32**



Uwaga! Wszystkie procesy i operacje jednostkowe prowadzono przy ograniczonym dostępie promieniowania świetlnego.

W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i strzykawkę umieszczono 300 mg (1 mmol) dasyloglicyny **3** oraz 115 mg (1 mmol) NHS, które rozpuszczono w 20 mL bezwodnego octanu etylu. Następnie chłodząc w łaźni lodowej wkroplono 226 mg (1.1 mmol) DCC rozpuszczonego w 5 mL bezwodnego octanu etylu. Po wkropleniu całej objętości roztworu DCC, mieszaninę reakcyjną pozostawiono stałe mieszając w temperaturze pokojowej na 24h. Następnie odsączono osad DCU, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 300 mg surowego produktu **32**, który użyto w kolejnych reakcjach bez dalszego oczyszczania.

N^3 -dasyloglicylo- N^1, N^7 -di-deoksycholoilospermidyna **18**



Uwaga! Wszystkie procesy i operacje jednostkowe prowadzono przy ograniczonym dostępie promieniowania świetlnego.

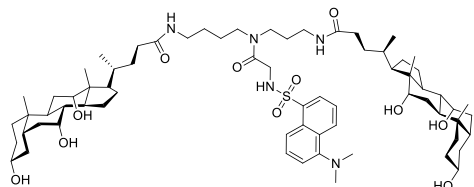
W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i strzykawkę, umieszczono 300 mg surowego estru N -hydroksysukcynoimidylowego dasyloglicyny **32**, który rozpuszczono w 10 mL chloroformu. Następnie stałe



mieszając wkroplono 900 mg (1 mmol) parasola molekularnego **30**, rozpuszczonego w 20 mL chloroformu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono stale mieszając w temperaturze pokojowej na 24h. Mieszaninę reakcyjną przemyto następnie nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x10 mL) i wodą (2x10 mL). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono na drodze PLC stosując jako fazę ruchomą mieszaninę CHCl₃/MeOH, 5/0.5, v/v. Otrzymano 6 mg (5.06 μmol, 0.5%) produktu **18** w postaci zielonożółtego ciała stałego o R_f 0.20 (CHCl₃/MeOH, 5/0.5, v/v).

MS-ESI: *m/z* obliczone dla C₆₉H₁₀₉N₅O₉S 1183.7946; znalezione 1184.8791 [M+1]⁺.

N³-dansyloglicylo-N¹,N⁷-di-choloilospermidyna **19**



Uwaga! Wszystkie procesy i operacje jednostkowe prowadzono przy ograniczonym dostępie promieniowania świetlnego.

Pochodną **19** otrzymano analogicznie jak związek **18**. Wychodząc z 290 mg (0.31 mmol) parasola molekularnego **31**, otrzymano

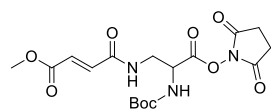
104 mg (85.5 μmol, 28%) produktu w postaci zielonożółtego ciała stałego o R_f 0.66 (CH₂Cl₂/MeOH, 5/1, v/v).

MS-ESI: *m/z* obliczone dla C₆₉H₁₀₉N₅O₁₁S 1215.7844; znalezione 1214.7710 [M-1]⁻.

¹H NMR (CD₃OD) δ[ppm]: 8.56 (d, 1H), 8.38 (t, 1H), 8.23 (d, 1H), 7.59 (m, 2H), 7.28 (d, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.81 (m, 4H), 3.66 (m, 2H), 3.37 (m, 4H), 3.16 (m, 4H), 2.90 (m, 6H), 2.56 (m, 2H), 2.26 (m, 6H), 2.16-1.19 (m, 42H), 1.19-0.80 (m, 16H), 0.70 (s, 6H).

¹³C NMR (CD₃OD) δ[ppm]: 175.58, 175.41, 175.29, 175.19, 172.24, 172.16, 168.10, 167.74, 151.72, 135.23, 130.01, 129.78, 129.55, 128.80, 128.64, 127.77, 122.93, 119.23, 115.06, 78.08, 72.62, 71.47, 69.57, 69.22, 67.65, 66.62, 63.98, 46.52, 46.04, 44.40, 43.69, 43.39, 41.79, 41.55, 39.56, 39.01, 38.45, 38.31, 36.13, 35.49, 35.09, 34.72, 34.54, 32.79, 31.97, 30.47, 29.77, 28.21, 27.38, 26.80, 26.46, 26.22, 26.13, 25.52, 24.30, 22.86, 21.78, 18.82, 16.34, 12.67, 11.66.

(S)-N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroilo)-2,3-diaminopropanian N-hydroksy-sukcynimidylu **34**

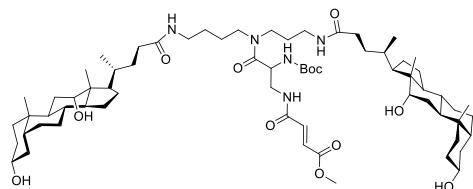


W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i strzykawkę, umieszczono 500 mg (1.6 mmol) Boc-FMDP **33** oraz 184 mg (1.6 mmol) NHS, które rozpuszczono w 25 mL bezwodnego tetrahydrofuranu. Następnie stale chłodząc w łaźni lodowej wkroplono 330 mg (1.6 mmol) DCC rozpuszczonego w 10 mL bezwodnego tetrahydrofuranu. Po wkropleniu całej objętości roztworu DCC mieszaninę reakcyjną pozostawiono stale mieszając w temperaturze pokojowej na 24h. Następnie odsączono wytrącony osad DCU, przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem i ponownie rozpuszczono w 50 mL chloroformu, po czym przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x20 mL) i wodą (2x20 mL). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod



zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 540 mg (1.3 mmol, 81%) surowego produktu **34** w postaci żółtawego ciała stałego, który wykorzystano w kolejnych etapach bez dalszego oczyszczania.

N^3 -[N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-2,3-diaminopropanoilo]- N^1, N^7 -di-deoksycholoilospermidyna **35**



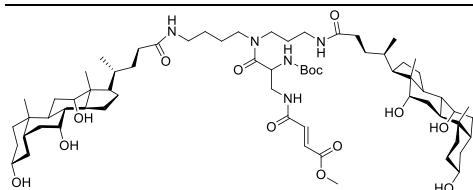
W kolbie kulistej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i strzykawkę, umieszczono 600 mg (0.67 mmol) parasola molekularnego **30**, który rozpuszczono w 20 mL chloroformu. Następnie stale mieszając wkropiono 278 mg (0.67 mmol) estru NHS Boc-FMDP **34**

rozpuszczonego w 10 mL chloroformu. Mieszaninę pozostawiono stale mieszając w temperaturze pokojowej na 24h. Następnie mieszaninę reakcyjną przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x10 mL) i wodą (2x10 mL). Frakcję organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 6.5/1/0.1, v/v/v. Otrzymano 417 mg (0.35 mmola, 52%) produktu **35** w postaci białego ciała stałego o t_t 120-125°C i R_f 0.50 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 6.5/1/0.1, v/v/v). HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{68}\text{H}_{113}\text{N}_5\text{O}_{12}$ 1191.8385; znalezione 1192.8408 [$\text{M}+1$]⁺.

¹H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.01 (d, 1H), 6.75 (m, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.81 (m, 4H), 3.75-3.11 (m, 10H), 2.56 (m, 2H), 2.26 (m, 2H), 2.14 (m, 2H), 2.02-0.89 (m, 75H), 0.72 (m, 6H).

¹³C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.33, 172.07, 170.66, 168.39, 165.79, 136.11, 129.34, 79.31, 72.48, 71.08, 69.62, 69.23, 66.65, 64.00, 61.22, 51.28, 46.70, 46.10, 42.20, 40.40, 36.41, 36.07, 35.79, 35.48, 35.05, 34.74, 34.60, 33.91, 33.41, 32.82, 31.99, 30.47, 29.68, 28.52, 27.29, 27.05, 26.10, 25.36, 24.63, 23.53, 22.37, 18.81, 16.31, 12.66, 11.85.

N^3 -[N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-2,3-diaminopropanoilo]- N^1, N^7 -di-choloilospermidyna **36**



Pochodną **36** otrzymano analogicznie jak związek **35**. Wychodząc z 1.2 g (1.3 mmol) parasola molekularnego **31** i 0.54 g (1.3 mmol) estru aktywnego Boc-FMDP **34** otrzymano 320 mg (0.26 mmola, 20%) produktu w postaci białego ciała stałego o t_t 175-177°C i R_f 0.36

(AcOEt/MeOH/ H_2O , 6.5/2/0.1, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{68}\text{H}_{113}\text{N}_5\text{O}_{14}$ 1223.8284; znalezione 1222.8245 [$\text{M}-1$]⁻.

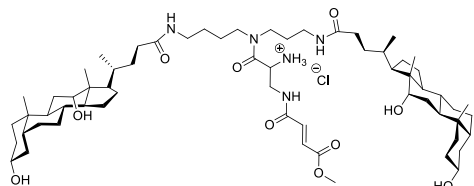
¹H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.01 (d, 1H), 6.75 (m, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.81 (m, 5H), 3.73-3.11 (m, 10H), 2.57 (m, 2H), 2.38-2.20 (m, 6H), 2.15 (m, 2H), 2.07-1.21 (m, 52H), 1.20-0.84 (m, 16H), 0.72 (m, 6H).

¹³C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.30, 172.14, 170.75, 165.06, 165.22, 136.00, 129.34, 79.31, 72.60, 71.49, 69.54, 69.21, 67.68, 66.64, 63.94, 51.26, 46.65, 46.11, 41.79, 41.53, 39.62,



39.07, 36.37, 35.58, 35.08, 34.70, 34.46, 32.88, 31.92, 30.42, 29.80, 28.18, 27.30, 26.42, 22.81, 21.76, 18.82, 16.40, 12.66, 11.66.

Chlorowodorek N^3 -[N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-2,3-diaminopropanoilo]- N^1, N^7 -di-deoksycholoilospemidyny **8**



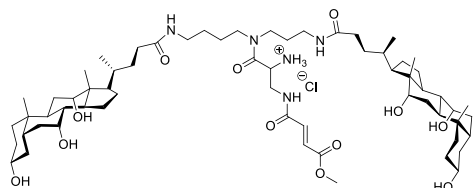
W kolbie kulistej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, umieszczono 82 mg (67.6 μ mol) związku **35**, który rozpuszczono w 10 mL metanolu nasyconego gazowym chlorowodem. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono stale mieszając w temperaturze

pokojoyej na 4h. Następnie odparowano rozpuszczalnik, a pozostałość przemyto kilkukrotnie eterem dietylowym. Produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 6.5/1/0.1, v/v/v. Otrzymano 30 mg (26.7 μ mol, 40%) produktu **8** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.18 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 6.5/1/0.1, v/v/v) i tt 140-145°C.

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{63}\text{H}_{106}\text{N}_5\text{O}_{10}$ 1127.7628; znalezione 1126.7532 [M-1].

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.03 (m, 1H), 6.75 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.89-3.10 (m, 13H), 2.26 (m, 2H), 2.12 (m, 2H), 2.01-0.79 (m, 68H), 0.71 (s, 6H).

Chlorowodorek N^3 -[N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-2,3-diaminopropanoilo]- N^1, N^7 -di-deoksycholoilospemidyny **9**



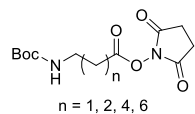
Pochodną **9** otrzymano analogicznie jak związek **8**. Wychodząc z 50 mg (40.8 μ mol) związku **36**, otrzymano 40 mg (34.4 μ mol, 84%) produktu w postaci białego ciała stałego o tt 206-210°C i R_f 0.6 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 6/3/0.2, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{63}\text{H}_{106}\text{ClN}_5\text{O}_{12}$ 1159.7526; znalezione 1158.7403 [M-1].

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.05 (m, 1H), 6.80 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.80 (m, 5H), 3.72-3.09 (m, 10H), 2.27 (m, 6H), 2.13 (m, 2H), 2.04-1.19 (m, 44H), 1.18-0.79 (m, 16H), 0.71 (s, 6H).

7.2.3. Synteza parasoli molekularnych z łącznikiem ω -aminoacylowym

Estry N -hydroksysukcynimidylowe Boc- ω -aminokwasów – metoda ogólna



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i wkraplacz, umieszczono 1 mmol ω -aminokwasu oraz 126 mg (1.5 mmol) węglanu sodu, które rozpuszczono w wodzie. Następnie mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej do temperatury 0°C i wkraplano 218 mg (1 mmol)

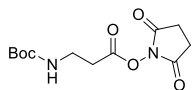
Boc_2O rozpuszczonego w 5 mL 1,4-dioksanu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w łaźni lodowej przez 1h, a następnie ogrzano do temperatury pokojowej i pozostawiono na 24h.



Po tym czasie odparowano 1,4-dioksan, a do pozostałości dodano niewielką objętość wody celem wyklarowania roztworu. Wodny roztwór przemyto octanem etylu, a następnie zakwaszono 1M HCl do pH 1-2. Frakcję wodną ekstrahowano octanem etylu. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując produkt – Boc- ω -aminokwas w postaci bezbarwnego oleju, krystalizującego po ochłodzeniu. Produkt w postaci surowej został wykorzystany w kolejnym etapie.

W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i wkraplacz, umieszczono 1 mmol Boc- ω -aminokwasu oraz 115 mg (1 mmol) NHS, które rozpuszczono w 10 mL bezwodnego tetrahydrofuranu. Następnie chłodząc w łaźni lodowej i stale mieszając wkroplono roztwór 258 mg (1.2 mmol) DCC w 5 mL bezwodnego tetrahydrofuranu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24h. Następnie odsączono osad DCU, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w chloroformie (ok. 20 mL) i przemyto wodą, nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu oraz ponownie wodą. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono otrzymując surowy produkt w postaci jasnożółtego oleju krystalizującego po ochłodzeniu. Otrzymany produkt – ester *N*-hydroksysukcynimidylowy Boc- ω -aminokwasu krystalizowano z mieszaniny octan etylu/heksan.

3-(*N*-*tert*-butoksykarbonyloamino)propanian *N*-hydroksysukcynimidylu **45**

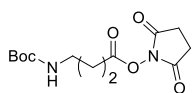


Wychodząc z 3.05 g (34 mmol) kwasu 3-aminopropanowego **37**, otrzymano 6.3 g (22 mmol, 66%) produktu **45** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.46 (Hex/AcOEt, 1/1, v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{12}H_{18}N_2O_6$ 286.1165; znalezione 287.1221 $[M+1]^+$.

1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 5.14 (s, 1H), 3.53 (m, 2H), 2.86 (m, 6H), 1.45 (s, 9H).

4-(*N*-*tert*-butoksykarbonyloamino)butanian *N*-hydroksysukcynimidylu **46**

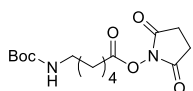


Wychodząc z 2.89 g (28 mmol) kwasu 4-aminobutanowego **38**, otrzymano 5.4 g (18 mmol, 64%) produktu **46** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.60 (Hex/AcOEt, 1/1, v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{13}H_{20}N_2O_6$ 300.1321; znalezione 301.1335 $[M+1]^+$.

1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 4.77 (s, 1H), 3.24 (m, 2H), 2.85 (s, 4H), 2.67 (t, 2H), 1.95 (t, 2H), 1.45 (s, 9H)

6-(*N*-*tert*-butoksykarbonyloamino)heksanian *N*-hydroksysukcynimidylu **47**

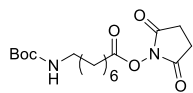


Wychodząc z 3.02 g (23 mmol) kwasu 6-aminoheksanowego **39**, otrzymano 4.93 g (15 mmol, 65%) produktu **47** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.40 (Hex/AcOEt, 1/1, v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{15}H_{24}N_2O_6$ 328.1634; znalezione 329.1602 $[M+1]^+$.

1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 4.60 (s, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.84 (m, 4H), 2.60 (t, 2H), 1.77 (q_i, 2H), 1.51 (m, 2H), 1.45 (m, 1H).

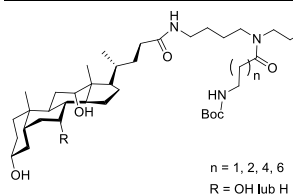


8-(*N*-*tert*-butoksykarbonyloamino)oktanian *N*-hydroksysukcynimidylu **48**

Wychodząc z kwasu 716 mg (4.5 mmol) 8-aminooktanowego **40**, otrzymano 1.03 g (2.88 mmol, 64%) produktu **48** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.58 (Hex/AcOEt, 1/1, v/v).

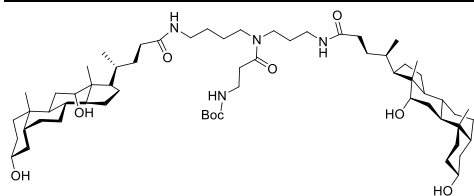
HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{17}H_{28}N_2O_6$ 356.1947; znalezione 357.1972 $[M+1]^+$.

1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 4.52 (s, 1H), 3.12 (t, 2H), 2.85 (s, 4H), 2.61 (t, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.55-1.25 (m, 17H).

Koniugaty parasoli deoksycholowego i cholowego z Boc- ω -aminokwasami – metoda ogólna

W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i strzykawkę umieszczono 1 mmol parasola deoksycholowego **30** lub cholowego **31**, który rozpuszczono w 20 mL chloroformu z niewielkim dodatkiem (ok. 5 mL) bezwodnego *N,N*-dimetyloformamidu.

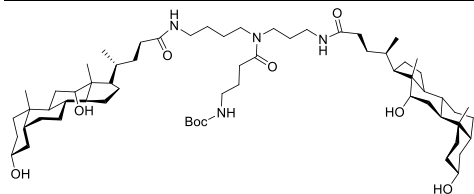
Następnie wprowadzono 140 μ L (1 mmol) bezwodnej trietyloaminy. Stale mieszając wkroplono roztwór 1.3 mmol Boc- ω -aminokwasu w 5 mL chloroformu. Następnie mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 60h. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki, a surowy produkt w postaci jasnego oleju oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników $CHCl_3/MeOH/H_2O$, 65(60)/10/1, v/v/v, otrzymując produkt w postaci białego ciała stałego.

 N^3 -(*N*-*tert*-butoksykarbonylo-3-aminopropanoilo)- N^1,N^7 -di-deoksychoilispermidyna **22**

Wychodząc z 1 g (1.11 mmol) parasola deoksycholowego **30** oraz 412 mg (1.44 mmol) estru NHS kwasu Boc-3-aminopropanowego **45**, otrzymano 1.05 g (1 mmol, 90%) produktu **22** w postaci białego ciała stałego o t_t 70-72°C i R_f 0.44 ($CHCl_3/MeOH/H_2O$, 65/10/1, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{63}H_{108}N_4O_9$ 1064.8116; znalezione 1065.8187 $[M+1]^+$.

1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 8.00 (m, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.34 (m, 6H), 3.18 (m, 4H), 2.56 (m, 2H), 2.26 (m, 2H), 2.12 (m, 2H), 1.96-1.69 (m, 16H), 1.67-1.24 (m, 41H), 1.23-0.86 (m, 18H), 0.70 (s, 6H).

 N^3 -(*N*-*tert*-butoksykarbonylo-4-aminobutanoilo)- N^1,N^7 -di-deoksychoilispermidyna **23**

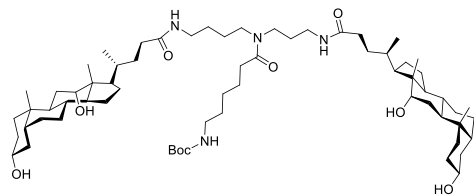
Wychodząc z 1 g (1.12 mmol) parasola deoksycholowego **30** oraz 438 mg (1.46 mmol) estru NHS kwasu Boc-4-aminobutanowego **46**, otrzymano 1 g (0.93 mmol, 83%) produktu **23** w postaci białego ciała stałego o t_t 105-110°C i R_f 0.55

($CHCl_3/MeOH/H_2O$, 60/10/1, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{64}H_{110}N_4O_9$ 1078.8273; znalezione 1079.8343 $[M+1]^+$.

1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 3.97 (s, 2H), 3.54 (m, 2H), 3.35 (m, 4H), 3.19 (m, 4H), 3.09 (m, 2H), 2.39 (m, 2H), 2.25 (m, 2H), 2.13 (m, 2H), 1.96-1.69 (m, 18H), 1.67-1.24 (m, 41H), 1.22-0.85 (m, 18H), 0.70 (s, 6H).

N^3 -(*N*-*tert*-butoksykarbonylo-6-aminoheksanoilo)- N^1,N^7 -di-deoksycholoilospermidyna **24**



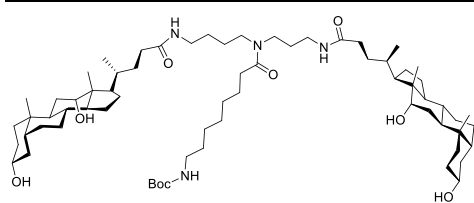
Wychodząc z 1 g (1.11 mmol) parasola deoksycholowego **30** oraz 470 mg (1.43 mmol) estru NHS kwasu Boc-6-aminoheksanowego **47**, otrzymano 0.73 g (0.66 mmol, 60%) produktu **24** w postaci białego ciała stałego o t_f 125°C i R_f 0.40 ($CHCl_3/MeOH/H_2O$,

65/10/1, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{66}H_{114}N_4O_9$ 1106.8586; znalezione 1107.8666 $[M+1]^+$.

1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 8.00 (m, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.35 (m, 4H), 3.20 (m, 4H), 3.05 (q, 2H), 2.37 (m, 2H), 2.26 (m, 2H), 2.11 (m, 2H), 1.96-1.69 (m, 18H), 1.67-1.23 (m, 45H), 1.23-1.04 (m, 4H), 1.02 (m, 6H), 0.94 (s, 8H), 0.71 (s, 6H).

N^3 -(*N*-*tert*-butoksykarbonylo-8-aminoooktanoilo)- N^1,N^7 -di-deoksycholoilospermidyna **25**

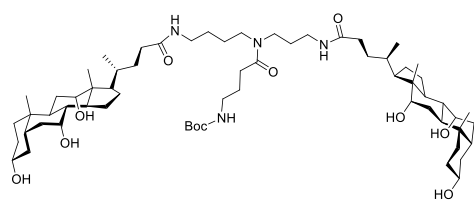


Wychodząc z 1.25 g (1.4 mmol) parasola deoksycholowego **30** oraz 649 mg (1.82 mmol) estru NHS kwasu Boc-8-aminoooktanowego **48**, otrzymano 1.4 g (1.25 mmol, 89%) produktu **25** w postaci oleju o R_f 0.62 ($CHCl_3/MeOH/H_2O$, 65/10/1, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{68}H_{118}N_4O_9$ 1134.890; znalezione 1135.881 $[M+1]^+$.

1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 3.96 (s, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.35 (m, 4H), 3.17 (m, 4H), 3.01 (t, 2H), 2.35 (m, 2H), 2.25 (m, 2H), 2.11 (m, 2H), 1.96-1.69 (m, 18H), 1.67-1.23 (m, 49H), 1.23-0.89 (m, 18H), 0.70 (s, 6H).

N^3 -(*N*-*tert*-butoksykarbonylo-4-aminobutanoilo)- N^1,N^7 -di-choloilospermidyna **26**



Wychodząc z 750 mg (0.81 mmol) parasola cholowego **31** oraz 315 mg (1.05 mmol) estru NHS kwasu Boc-4-aminobutanowego **46**, otrzymano 604 mg (0.54 mmol, 67%) produktu **26** w postaci oleju o R_f 0.49 ($CHCl_3/MeOH/H_2O$, 65/10/1, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{64}H_{110}N_4O_{11}$ 1110.8171; znalezione 1111.8180 $[M+1]^+$.

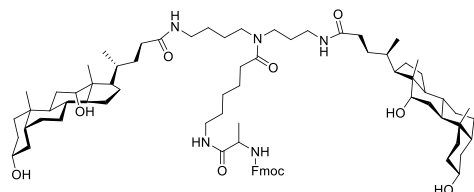
1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 3.96 (s, 2H), 3.80 (s, 2H), 3.35 (m, 6H), 3.20 (m, 4H), 3.09 (m, 2H), 2.40 (m, 2H), 2.27 (m, 6H), 2.12 (m, 2H), 2.06-1.70 (m, 18H), 1.70-1.22 (m, 35H), 1.21-0.87 (m, 16H), 0.71 (s, 6H).



^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.80 (m, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.30 (m, 2H), 4.33 (m, 2H), 4.19 (m, 1H), 4.08 (m, 1H), 3.92 (m, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.35-3.09 (m, 10H), 2.37 (m, 2H), 2.21 (m, 2H), 2.08 (m, 2H), 1.93-1.64 (m, 18H), 1.64-1.19 (m, 35H), 1.18-0.85 (m, 18H), 0.67 (d, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.46, 174.40, 173.46, 163.43, 156.67, 143.92, 143.82, 141.19, 127.46, 127.37, 126.79, 124.83, 119.58, 72.53, 71.01, 66.52, 46.72, 46.15, 43.18, 42.18, 36.02, 35.77, 35.56, 35.42, 35.02, 33.92, 33.41, 32.87, 31.95, 30.19, 29.62, 28.54, 27.33, 27.00, 26.04, 24.82, 23.53, 22.38, 16.97, 16.69, 16.33, 11.90.

N^3 -[*N*-(*N*-fluorenylmetoksykarbonylo-L-alanylo)-6-aminoheksanoilo]- N^1, N^7 -di-deoksycholoilospermidyna **57**



Wychodząc z 200 mg (0.2 mmol) chlorowodoru parasola deoksycholowego z resztą kwasu 6-aminoheksanowego **51**, 100 mg (0.24 mmol) Fmoc-L-Ala-NHS **55** oraz 200 μL (1.15 mmol) DIPEA, otrzymano 138 mg (0.11 mmol, 55%) produktu **57** w postaci białej

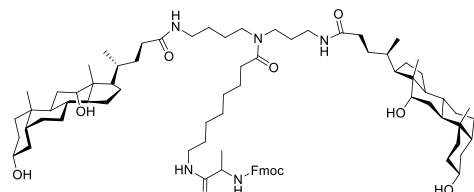
szklistej piany o R_f 0.37 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65/10/1, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{79}\text{H}_{121}\text{N}_5\text{O}_{10}$ 1299.911; znalezione 1300.916 [$\text{M}+1$] $^+$.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.81 (d, 2H), 7.67 (t, 2H), 7.40 (t, 2H), 7.31 (t, 2H), 4.35 (d, 2H), 4.22 (t, 1H), 4.11 (q, 1H), 3.93 (m, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.31 (m, 4H), 3.19 (m, 6H), 2.32 (m, 2H), 2.25 (m, 2H), 2.08 (m, 2H), 1.95-1.65 (m, 18H), 1.65-1.21 (m, 39H), 1.21-0.84 (m, 18H), 0.67 (d, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.59, 175.13, 174.05, 156.60, 143.68, 141.15, 127.42, 126.87, 124.86, 119.51, 72.47, 71.19, 66.59, 50.76, 44.67, 46.23, 45.20, 43.24, 42.22, 38.78, 38.54, 38.33, 36.48, 36.41, 36.06, 35.80, 35.48, 35.05, 33.90, 33.39, 32.79, 32.39, 32.07, 29.65, 29.25, 28.78, 28.49, 27.35, 27.03, 26.38, 26.06, 24.82, 24.61, 23.45, 22.36, 17.14, 16.29, 11.90.

N^3 -[*N*-(*N*-fluorenylmetoksykarbonylo-L-alanylo)-8-aminooktanoilo]- N^1, N^7 -di-deoksycholoilospermidyna **58**



Wychodząc z 200 mg (0.2 mmol) chlorowodoru parasola deoksycholowego z resztą kwasu 8-aminooktanowego **52**, 140 mg (0.34 mmol) Fmoc-L-Ala-NHS **55** oraz 300 μL DIPEA, otrzymano 100 mg (0.08 mmol, 40%) produktu **58** w postaci białej szklistej

piany o R_f 0.45 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65/10/1, v/v/v).

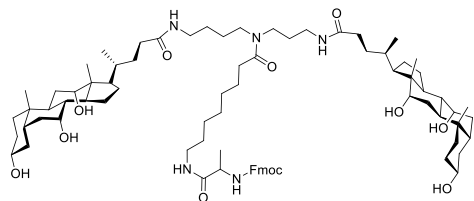
HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{81}\text{H}_{125}\text{N}_5\text{O}_{10}$ 1327.943; znalezione 1328.947 [$\text{M}+1$] $^+$.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.81 (d, 2H), 7.67 (t, 2H), 7.38 (t, 2H), 7.31 (t, 2H), 4.37 (m, 2H), 4.21 (t, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.32 (m, 4H), 3.16 (m, 6H), 2.27 (m, 4H), 2.12 (m, 2H), 1.94-1.65 (m, 18H), 1.65-1.21 (m, 43H), 1.19-0.84 (m, 18H), 0.67 (s, 6H).



^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.29, 174.01, 163.40, 156.67, 143.78, 141.17, 127.48, 126.82, 124.88, 119.55, 72.64, 71.06, 66.58, 50.77, 46.62, 46.09, 45.25, 43.14, 42.15, 36.04, 35.80, 35.58, 35.43, 35.04, 33.85, 33.41, 32.87, 32.50, 32.02, 30.26, 29.67, 28.96, 28.81, 28.54, 27.35, 27.00, 26.37, 26.07, 25.08, 25.24, 24.66, 23.53, 22.36, 17.16, 16.32, 11.90.

N^3 -[N -(N -fluorenylometoksykarbonylo- L -alanilo)-8-aminooktanoilo]- N^1, N^7 -dicholoiłospermidyna **59**



Wychodząc z 400 mg (0.3 mmol) chlorowodorku parasola cholowego z resztą kwasu 8-aminooktanowego **54**, 249 mg (0.55 mmol) Fmoc- L -Ala-NHS **55** oraz 1 mL DIPEA, otrzymano 284 mg (0.21 mmol, 70%) produktu **59** w postaci białej szklistej piany

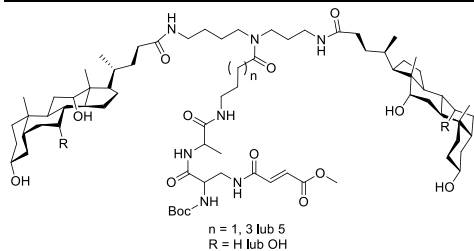
o R_f 0.40 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65/10/1, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{81}\text{H}_{125}\text{N}_5\text{O}_{12}$ 1359.932; znalezione 1360.953 [$M+1$] $^+$.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.81 (d, 2H), 7.67 (t, 2H), 7.41 (t, 2H), 7.31 (t, 2H), 4.35 (m, 2H), 4.22 (m, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.32 (m, 6H), 3.18 (m, 6H), 2.35-2.19 (m, 8H), 2.12 (m, 2H), 2.05-1.62 (m, 18H), 1.63-1.19 (m, 37H), 1.18-0.83 (m, 16H), 0.68 (s, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.36, 174.17, 173.81, 173.47, 143.80, 141.07, 127.31, 126.78, 124.77, 119.57, 78.09, 72.61, 71.39, 67.64, 66.49, 54.39, 50.76, 46.62, 46.05, 45.54, 45.16, 43.24, 42.34, 41.76, 41.56, 39.61, 39.07, 38.52, 38.35, 36.53, 35.52, 35.11, 34.47, 32.80, 32.51, 32.01, 29.74, 28.98, 28.81, 28.64, 26.44, 25.89, 25.23, 24.89, 24.68, 22.83, 21.82, 17.11, 16.36, 11.67.

Koniugat parasola molekularnego z ω -aminokwasem, L -alaniną i Boc-FMDP – metoda ogólna

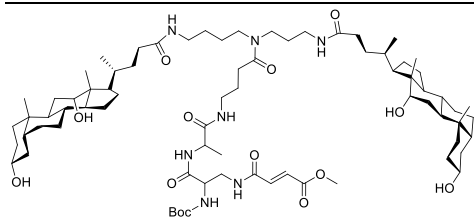


W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i zabezpieczonej przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono 0.08 mmol koniugatu parasola molekularnego z ω -aminokwasem i Fmoc-alaniną **56-59**, który rozpuszczono w 4 mL mieszaniny N,N -dimetyloformamid/pirolidyna,

3/1, v/v i mieszano w temperaturze pokojowej przez 3h. Po tym czasie rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 5 mL bezwodnego N,N -dimetyloformamidu, po czym wprowadzono kolejno 100 μL (0.57 mmol) DIPEA i 40 mg (0.09 mmol) Boc-FMDP-NHS **34**. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65/10/1, v/v/v.



N^3 -{ N -[N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-2,3-diaminopropanoilo]- L -alanylo]-4-aminobutanoilo}- N^1, N^7 -di-deoksycholoilospermidyna **64**



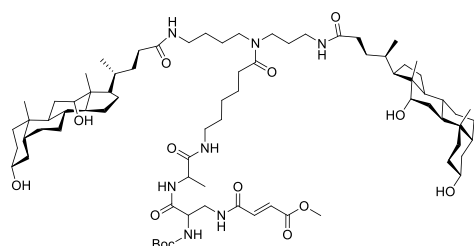
Wychodząc z 220 mg (0,17 mmol) konigatu **56**, 106 mg (0.26 mmol) Boc-FMDP-NHS **34** i 200 μ L (1.15 mmol) DIPEA, otrzymano 116 mg (0.082 mmol, 48%) produktu **64** w postaci jasnobieżowego ciała stałego.
HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{75}H_{125}N_7O_{14}$

1347.928; znalezione 1348.932 $[M+1]^+$.

1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.04 (d, 1H), 6.75 (d, 1H), 4.31 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.70-3.49 (m, 4H), 3.42-3.11 (m, 10H), 2.41 (m, 2H), 2.25 (m, 2H), 2.11 (m, 2H), 1.97-1.68 (m, 18H), 1.68-1.23 (m, 44H), 1.21-0.88 (m, 18H), 0.71 (s, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.56, 175.31, 173.52, 173.27, 173.06, 171.11, 165.77, 165.33, 136.17, 129.50, 109.97, 79.64, 78.01, 72.55, 71.08, 54.78, 51.21, 49.38, 46.68, 46.38, 46.21, 45.51, 45.27, 43.27, 42.17, 40.79, 38.48, 38.34, 36.41, 36.07, 35.79, 35.51, 35.06, 33.92, 33.37, 32.82, 32.03, 29.65, 27.37, 26.99, 26.16, 23.44, 22.40, 16.30, 11.88.

N^3 -{ N -[N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-2,3-diaminopropanoilo]- L -alanylo]-6-aminoheksanoilo}- N^1, N^7 -di-deoksycholoilospermidyna **65**

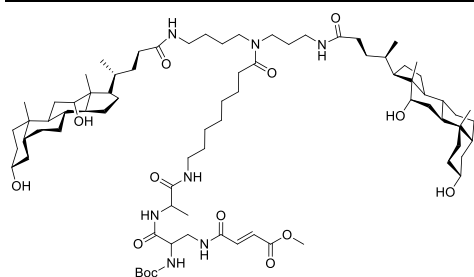


Wychodząc z 100 mg (0.08 mmol) konigatu **57**, 40 mg (0.09 mmol) Boc-FMDP-NHS **34** i 100 μ L (0.57 mmol) DIPEA, otrzymano 58 mg (0.042 mmol, 53%) produktu **65** w postaci jasnobieżowego ciała stałego.
HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{77}H_{129}N_7O_{14}$
1375.959; znalezione 1376.957 $[M+1]^+$.

1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.03 (d, 1H), 6.75 (d, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.72-3.48 (m, 4H), 3.34 (m, 4H), 3.28-3.09 (m, 6H), 2.36 (m, 2H), 2.26 (m, 2H), 2.12 (m, 2H), 1.96-1.69 (m, 18H), 1.66-1.22 (m, 48H), 1.21-0.87 (m, 18H), 0.72 (s, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.45, 173.09, 165.74, 146.70, 135.90, 129.50, 109.95, 72.55, 71.04, 51.17, 46.72, 46.15, 42.20, 38.87, 36.04, 35.77, 35.46, 35.02, 33.93, 33.40, 32.82, 32.38, 32.05, 29.69, 28.78, 28.51, 27.30, 26.96, 26.09, 24.89, 24.66, 23.45, 22.34, 16.37, 11.81.

N^3 -{ N -[N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-2,3-diaminopropanoilo]- L -alanylo]-8-aminoooktanoilo}- N^1, N^7 -di-deoksycholoilospermidyna **66**



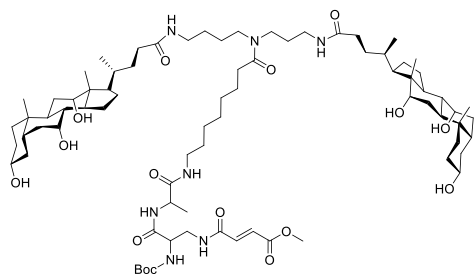
Wychodząc z 100 mg (0.08 mmol) konigatu **58**, 50 mg (0.12 mmol) Boc-FMDP-NHS **34** i 100 μ L (0.57 mmol) DIPEA, otrzymano 40 mg (0.032 mmol, 40%) produktu **66** w postaci jasnobieżowego ciała stałego.
HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{79}H_{133}N_7O_{14}$
1403.991; znalezione 1404.995 $[M+1]^+$.



^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.03 (d, 1H), 6.74 (d, 1H), 4.31 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.97 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.73-3.48 (m, 4H), 3.34 (m, 4H), 3.27-3.12 (m, 6H), 2.36 (m, 2H), 2.25 (m, 2H), 2.12 (m, 2H), 1.96-1.68 (m, 18H), 1.66-1.23 (m, 52H), 1.21-0.85 (m, 18H), 0.71 (s, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.32, 174.16, 173.86, 173.28, 170.87, 165.80, 136.19, 129.34, 79.54, 72.47, 71.06, 54.73, 51.31, 49.18, 46.72, 46.25, 45.59, 45.31, 42.11, 40.98, 39.03, 38.56, 38.18, 36.51, 36.06, 35.82, 35.48, 35.05, 33.95, 33.37, 32.79, 32.58, 32.00, 29.72, 29.05, 28.88, 28.54, 27.34, 27.05, 26.42, 26.12, 25.89, 25.29, 24.62, 23.49, 22.36, 16.83, 16.28, 11.86.

N^3 -{ N -[N -(N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-2,3-diaminopropanoiło)- L -alaniny]-8-aminooktanoilo}- N^1, N^7 -di-choloilospermidyna **67**



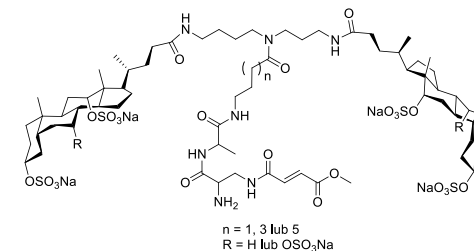
Wychodząc z 284 mg (0.21 mmol) konigatu **59**, 131 mg (0.32 mmol) Boc-FMDP-NHS **34** i 250 μL (0.60 mmol) DIPEA, otrzymano 179 mg (0.12 mmol, 57%) produktu **67** w postaci jasnobeżowego ciała stałego.

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{79}\text{H}_{133}\text{N}_7\text{O}_{16}$ 1435.981; znalezione 1436.983 $[\text{M}+1]^+$.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.03 (d, 1H), 6.74 (d, 1H), 4.31 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.79 (m, 5H), 3.68 (m, 1H), 3.56 (m, 1H), 3.43-3.28 (m, 6H), 3.18 (m, 6H), 2.36 (m, 2H), 2.28 (m, 6H), 2.13 (m, 2H), 2.07-1.70 (m, 18H), 1.70-1.21 (m, 46H), 1.20-0.89 (m, 16H), 0.71 (m, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.53, 175.28, 174.13, 173.75, 173.27, 170.88, 170.50, 165.86, 165.18, 156.33, 136.12, 129.37, 79.49, 78.13, 72.58, 71.42, 67.43, 54.49, 51.20, 49.33, 46.68, 46.38, 46.09, 45.54, 45.30, 43.17, 41.82, 41.61, 40.88, 39.64, 39.09, 38.53, 38.32, 36.48, 36.35, 35.54, 35.08, 34.51, 32.87, 32.84, 32.54, 32.01, 29.77, 29.04, 28.93, 28.20, 27.34, 27.18, 26.45, 25.91, 25.50, 25.29, 24.70, 23.97, 22.83, 21.83.

Zestryfikowany koniugat parasola molekularnego z ω -aminokwasem, L -alaniną i FMDP – metoda ogólna



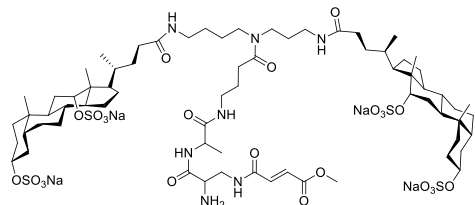
W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i zabezpieczonej przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono 0.042 mmol Boc-chronionego konigatu **64-67**, który rozpuszczono w 5 mL bezwodnego N,N -dimetyloformamidu, a następnie wprowadzono 5 mL bezwodnego

octanu etylu nasyconego gazowym chlorowodorem. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 3h. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość poddano dalszym przemianom bez późniejszego oczyszczania. Otrzymany produkt rozpuszczono w 5 mL bezwodnego N,N -dimetyloformamidu, a następnie dodano w jednej porcji 120 mg (0.756 mmol) kompleksu Py/SO_3 . Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24h.



Następnie mieszaninę zalkalizowano wodnym nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu do odczynu pH ~9. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników CHCl₃/MeOH/H₂O, 7/4/1, v/v/v.

Zestryfikowany koniugat parasola deoksyholowego z kwasem 4-aminopropanowym, L-alaniną i FMDP **10**

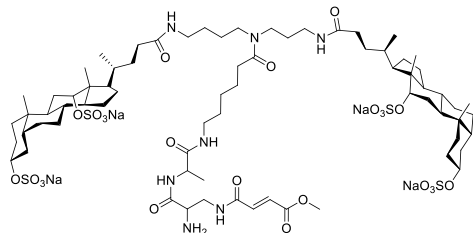


Wychodząc ze 116 mg (0.082 mmol) koniugatu **64** oraz 235 mg (1.47 mmol) kompleksu Py/SO₃, otrzymano 55 mg (0.033 mmol, 40%) produktu **10** w postaci białego ciała stałego.

¹H NMR (CD₃OD) δ[ppm]: 7.09 (m, 1H), 6.75 (m, 1H), 4.69 (s, 2H), 4.41 (m, 1H), 4.28 (m, 3H), 4.06 (m, 1H), 3.79 (m, 4H), 3.50-3.05 (m, 10H), 2.46 (m, 2H), 2.29 (m, 4H), 2.13 (m, 2H), 2.02-1.69 (m, 20H), 1.68-1.21 (m, 31H), 1.21-0.86 (m, 18H), 0.76 (s, 6H).

¹³C NMR (D₂O) δ[ppm]: 176.88, 176.68, 174.53, 174.05, 167.04, 166.35, 135.70, 130.11, 82.39, 80.55, 52.96, 52.71, 52.17, 50.19, 48.74, 48.27, 46.03, 45.77, 41.82, 40.62, 38.91, 38.60, 35.71, 35.44, 34.57, 33.68, 33.43, 33.04, 32.63, 32.07, 29.92, 27.63, 27.01, 26.06, 24.78, 23.72, 22.75, 17.01, 16.78, 12.18.

Zestryfikowany koniugat parasola deoksyholowego z kwasem 6-aminoheksanowym, L-alaniną i FMDP **11**



Wychodząc z 58 mg (0.042 mmol) koniugatu **64** oraz 120 mg (0.756 mmol) kompleksu Py/SO₃, otrzymano 70 mg (0.041 mmol, 97%) produktu **11** w postaci białego ciała stałego.

¹H NMR (CD₃OD) δ[ppm]: 7.08 (d, 1H), 6.80 (d, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.40 (m, 1H), 4.29 (m, 2H), 4.13 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.40 (m, 4H), 3.25 (m, 6H), 2.40 (m, 2H), 2.27 (m, 4H), 2.17 (m, 2H), 2.03-1.71 (m, 22H), 1.71-1.23 (m, 33H), 1.23-0.91 (m, 18H), 0.78 (s, 6H).

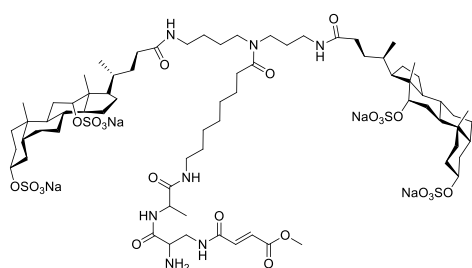
¹³C NMR (CD₃OD) δ[ppm]: 174.24, 165.68, 161.69, 135.91, 129.84, 99.91, 81.53, 79.35, 53.73, 51.35, 45.75, 42.33, 38.75, 35.86, 34.99, 33.93, 33.68, 33.23, 32.45, 31.83, 27.29, 26.68, 26.06, 24.83, 23.26, 22.31, 17.49, 17.13, 16.79, 11.44.

Zestryfikowany koniugat parasola deoksyholowego z kwasem 8-aminooktanowym, L-alaniną i FMDP **12**

Wychodząc z 40 mg (0.032 mmol) koniugatu **66** oraz 100 mg (0.576 mmol) kompleksu Py/SO₃, otrzymano 15 mg (8.8 μmol, 27%) produktu **12** w postaci białego ciała stałego.

¹H NMR (CD₃OD) δ[ppm]: 7.08 (d, 1H), 6.78 (d, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.39 (m, 1H), 4.28 (m, 2H), 3.98 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.80 (m, 4H), 3.37 (s, 4H), 3.22 (m, 6H), 2.37



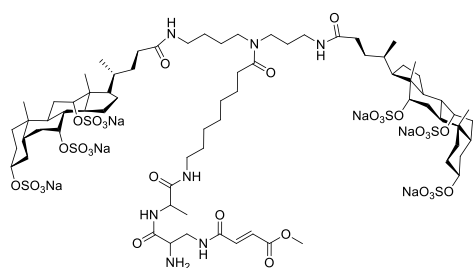


(m, 2H), 2.27 (m, 4H), 2.14 (m, 2H), 2.01-1.69 (m, 22H), 1.68-1.21 (m, 37 H), 1.21-0.87 (m, 18H), 0.76 (m, 6H).

^{13}C NMR (D_2O) δ [ppm]: 177.12, 176.98, 176.73, 175.27, 173.87, 167.06, 166.10, 136.03, 129.86, 82.66, 80.73, 55.38, 53.10, 52.62, 50.18, 48.74, 48.32, 46.30, 46.10, 45.75, 41.87, 39.52, 38.35, 37.37, 36.75,

36.42, 35.87, 35.16, 34.54, 33.72, 33.36, 33.01, 32.68, 32.12, 31.22, 29.00, 28.73, 27.01, 26.03, 25.41, 24.79, 24.15, 23.68, 23.20, 22.58, 17.10, 16.68, 12.19.

Zestryfikowany koniugat parasola cholowego z kwasem 8-aminooktanowym, L-alaniną i FMDP **13**



Wychodząc z 179 mg (0.12 mmol) koniugatu **67** oraz 573 mg (3.60 mmol) kompleksu Py/SO_3 , otrzymano 60 mg (0.03 mmol, 26%) produktu **13** w postaci białego ciała stałego.

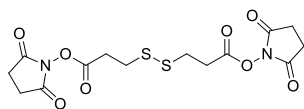
^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.06 (d, 1H), 6.79 (m, 1H), 4.69 (s, 2H), 4.47 (s, 2H), 4.41 (m, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.82 (m, 4H), 3.63 (m, 1H), 3.52-3.08 (m, 12H), 2.50-2.21 (m, 10H), 2.19-1.16

(m, 55H), 1.16-0.85 (m, 16H), 0.77 (s, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.80, 175.48, 174.37, 174.14, 173.32, 173.07, 171.46, 165.84, 165.23, 163.60, 158.48, 135.95, 129.89, 116.78, 81.29, 79.78, 76.75, 53.71, 51.58, 50.95, 49.47, 45.94, 42.35, 41.80, 39.04, 38.27, 36.46, 35.68, 35.46, 34.98, 34.21, 32.70, 31.77, 30.19, 28.86, 27.69, 27.24, 26.21, 25.88, 25.25, 24.55, 22.45, 21.67, 16.88, 11.57.

7.2.5. Synteza parasoli molekularnych z łącznikiem *o*-ditiobenzoilokarbamiowym

Diester *N*-hydroksysukcynimidowy kwasu 3,3'-ditiopropanowego **81**



W kolbie kulistej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i rurkę z chlorkiem wapnia umieszczono 2 g (9.5 mmol) kwasu 3,3'-ditiopropanowego **80** i 2.2 g (19 mmol) NHS, które rozpuszczono w 70 mL bezwodnego tetrahydrofuranu.

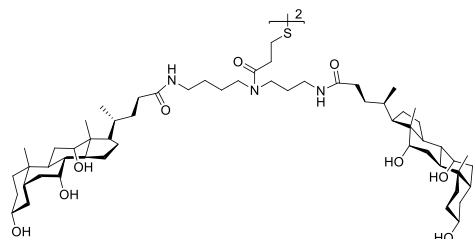
Następnie stale mieszając i chłodząc w łaźni lodowej wkropiono 4 g (19 mmol) DCC rozpuszczonego w 50 mL bezwodnego tetrahydrofuranu. Mieszanie kontynuowano w temperaturze pokojowej przez 24h. Następnie odsączono wytrącony osad DCU, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w chloroformie i przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x50 mL), a następnie wodą (2x50 mL). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono. Surowy produkt krystalizowano



z mieszaniny chloroform/heksan, otrzymując 2.30 g (5.69 mmol, 60%) produktu **81** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.16 (heksan/AcOEt, 1/1, v/v) i tt 105-110°C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 3.10 (t, 4H), 3.02 (t, 4H), 2.85 (s, 8H).

Homodimer parasola cholowego **83**



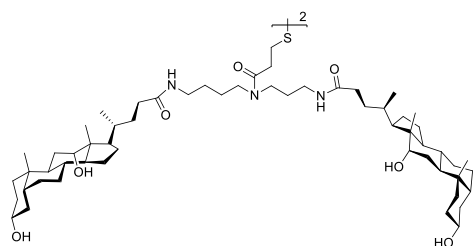
W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i rurkę z chlorkiem wapnia umieszczono 2 g (2.16 mmol) parasola molekularnego **31**, który rozpuszczono w 50 mL suchego *N,N*-dimetyloformamidu, po czym wprowadzono 1 mL (5.74 mmol) DIPEA.

Po 10 minutach do mieszaniny reakcyjnej dodano 440 mg (1.08 mmol) związku **81** i pozostawiono stale mieszając w temperaturze pokojowej na 48h. Następnie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostały surowy produkt oczyszczano na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 30/9/1, v/v/v. Otrzymano 1.41 g (0.7 mmol, 65%) produktu **83** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.67 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 30/9/1, v/v/v) i tt 150°C.

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{116}\text{H}_{196}\text{N}_6\text{O}_{18}\text{S}_2$ 2025.4048; znalezione 2026.4067 [$\text{M}+1$]⁺.

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 8.13-7.93 (m, 2H), 3.95 (s, 4H), 3.80 (s, 4H), 3.39 (m, 12H), 3.27-3.13 (m, 8H), 2.97 (m, 4H), 2.82 (m, 4H), 2.35-2.20 (m, 12H), 2.13 (m, 4H), 2.07-1.70 (m, 32H), 1.70-1.22 (m, 52H), 1.19-1.05 (m, 4H), 1.05-0.94 (m, 16H), 0.92 (s, 12H), 0.72 (s, 12H).

Homodimer parasola deoksycholowego **82**



Pochodną **82** otrzymano analogicznie jak związek **83**. Wychodząc z 2 g (2.24 mmol) parasola molekularnego **30** i 453 mg (1.12 mmol) związku **81**, otrzymano 1.38 g (0.71 mmol, 63%) produktu **82** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.30 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 15/2/0.2, v/v/v) i tt 110°C.

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{116}\text{H}_{196}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_2$

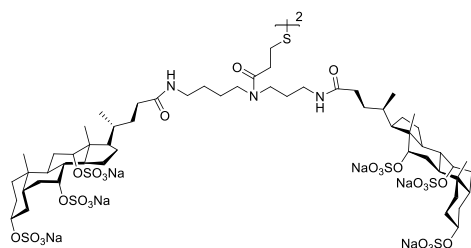
1961.4251; znalezione 1962.4385 [$\text{M}+1$]⁺.

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 8.14-7.90 (m, 2H), 3.95 (s, 4H), 3.52 (m, 4H), 3.37 (m, 8H), 3.26-3.09 (m, 8H), 2.96 (m, 4H), 2.80 (m, 4H), 2.26 (m, 4H), 2.11 (m, 4H), 1.95-1.70 (m, 32H), 1.67-1.23 (m, 64H), 1.23-1.05 (m, 8H), 1.03-0.88 (m, 28H), 0.71 (s, 12H).

Zestryfikowany homodimer parasola cholowego **85**

W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i rurkę z chlorkiem wapnia umieszczono 1.336 g (0.66 mmol) homodimeru **83**, który rozpuszczono w 50 mL suchego *N,N*-dimetyloformamidu. Mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej do 0°C a następnie stale chłodząc i mieszając wprowadzono w jednej porcji 5.73 g (36 mmol) kompleksu SO_3/Py .



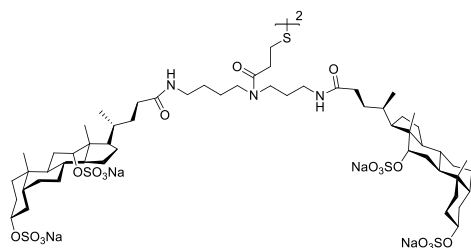


Mieszanie kontynuowano w temperaturze pokojowej przez 5.5h. Do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 20 mL wody, a następnie porcjami nasycony wodny roztwór wodorowęglanu sodu aż do uzyskania odczynu pH ~10. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 100 mL metanolu. Odsączono

nierozpuszczone sole nieorganiczne, a przesącz zatężono i oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników CHCl₃/MeOH/H₂O, 5/4/1, v/v/v. Otrzymano 1.183 g (0.36 mmol, 55%) produktu **85** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.30 (CHCl₃/MeOH/H₂O, 5/4/1, v/v/v) i tt 280°C (rozkład).

¹H NMR (CD₃OD) δ[ppm]: 8.15-7.94 (m, 2H), 4.67 (s, 4H), 4.46 (s, 4H), 4.13 (m, 4H), 3.38 (m, 8H), 3.26-3.13 (m, 8H), 2.96 (m, 4H), 2.82 (m, 4H), 2.48-1.19 (m, 100H), 1.13-0.95 (m, 20H), 0.95 (s, 12H), 0.78 (s, 12H).

Zestryfikowany homodimer parasola deoksycholowego **84**

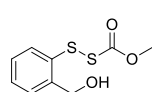


Pochodną **84** otrzymano analogicznie jak związek **85**. Wychodząc z 650 mg (0.331 mmol) homodimeru **82** i 1.9 g (12 mmol) kompleksu SO₃/Py otrzymano 560 mg (0.201 mmol, 61%) produktu **84** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.50 (CHCl₃/MeOH/H₂O, 5/4/1, v/v/v) i tt 240°C

(rozkład).

¹H NMR (CD₃OD) δ[ppm]: 4.69 (s, 4H), 4.28 (m, 4H), 3.44 (m, 8H), 3.29-3.13 (m, 8H), 3.02 (m, 4H), 2.86 (m, 4H), 2.34-2.23 (m, 4H), 2.18 (m, 4H), 2.01-1.24 (m, 104H), 1.18-0.88 (m, 28H), 0.77 (s, 12H).

S-(o-hydroksymetylenofenilo)-S'-metoksykarbonylodisulfid **88**



Uwaga! Reakcja prowadzona jest w atmosferze gazu obojętnego – argonu.

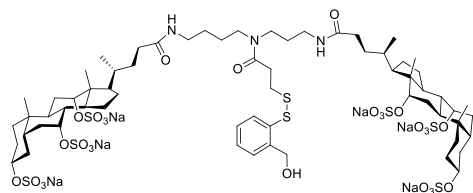
W kolbie kulistej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, umieszczono 10 mL bezwodnego dichlorometanu. Kolbę z rozpuszczalnikiem ochłodzono w łaźni lodowej do temperatury 0°C a następnie stale mieszając wprowadzono 100 μL (1.1 mmol) chlorku metoksykarbonylosulfenowego **87**. W kolejnym kroku, stale mieszając i chłodząc w lodzie, wkroplono 154 mg (1.1 mmol) alkoholu o-merkaptobenzylowego **86** rozpuszczonego w 5 mL bezwodnego dichlorometanu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono, stale mieszając, w temperaturze 0°C na 2h. Następnie mieszaninę reakcyjną przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x10 mL) i wodą (2x10 mL). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując surowy produkt w postaci oleju, który oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym,



stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 10/1, v/v. Otrzymano 200 mg (0.87 mmol, 79%) produktu **88** w postaci zielonkawego oleju, krzepnącego w niskiej temperaturze, o t_f 29-30°C i R_f 0.74 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 10/1, v/v).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 7.7 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 4.9 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 2.62 (brs, 1H).

Monomer **92**

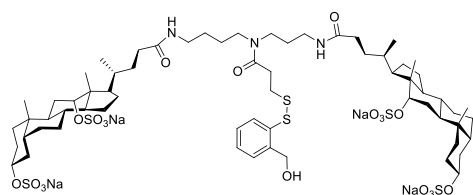


Uwaga! Reakcja prowadzona jest w atmosferze gazu obojętnego – argonu.

W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 1.136 g (0.35 mmol) homodimeru **85**, który rozpuszczono w 50 mL 1M sodowego buforu fosforanowego o pH 7.3. Następnie przygotowano roztwór 150 mg (0.52 mmol) TCEP w 10 mL takiego samego buforu, po czym doprowadzono odczyn pH otrzymanego roztworu do ~7 poprzez wprowadzenie niewielkiej ilości buforu. Przygotowany roztwór TCEP dodano w jednej porcji do wcześniej przygotowanego roztworu homodimeru **85** i pozostawiono stale mieszając w temperaturze pokojowej na 1h. Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostały osad zawieszono w 20 mL metanolu i odsączono pozostałość soli nieorganicznych. Przesącz zatężono a pozostały surowy produkt **90** wykorzystano w kolejnych etapach bez późniejszego oczyszczania. W kolbie kulistej zaopatrzonej w strzykawkę umieszczono otrzymany wcześniej związek **90**, który rozpuszczono w 50 mL MeOH. Następnie do mieszaniny wprowadzono 180 μL (1.3 mmol) bezwodnej trietyloaminy i pozostawiono stale mieszając na 10 min. Następnie wkroplono roztwór 193 mg (0.84 mmol) disulfidu **88** rozpuszczonego w 5 mL metanolu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono, stale mieszając, w temperaturze pokojowej na 5h. Po tym czasie rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w metanolu, oddzielono od soli nieorganicznych i ponownie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 5/4/1, v/v/v. Otrzymano 624 mg (0.35 mmol, 50%) produktu **92** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.50 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 5/4/1, v/v/v) i t_f 200°C (rozkład).

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 8.04 (m, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.49 (m, 1H), 7.33 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 4.68 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 4.14 (m, 2H), 3.29-3.06 (m, 9H), 3.00 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 2.48-1.20 (m, 50H), 1.14-0.99 (m, 10H), 0.95 (s, 6H), 0.77 (s, 6H).

Monomer **91**



Uwaga! reakcja prowadzona jest w atmosferze gazu obojętnego – argonu

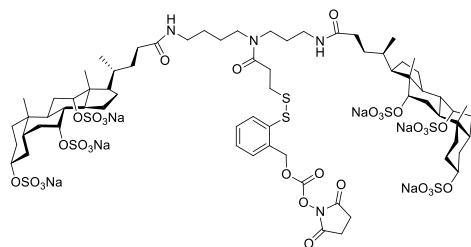
Pochodną **91** otrzymano anlogicznie jak związek **92**. Wychodząc z 2.36 g (0.85 mmol) homodimera **84** i 365 mg (1.275 mmol)



TCEP oraz i 470 mg (2.04 mmol) disulfidu **88** otrzymano 1.18 g (0.77 mmol, 45%) produktu **91** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.36 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 7/4/1 v/v/v) i tt 175°C.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 8.09 (m, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 4.69 (s, 2H), 4.28 (m, 2H), 3.37 (m, 4H), 3.22 (m, 4H), 3.01 (m, 2H), 2.78 (m, 2H), 2.26 (m, 2H), 2.16 (m, 2H), 2.02-1.69 (m, 22H), 1.66-1.23 (m, 30H), 1.15-0.89 (m, 14H), 0.75 (s, 6H).

Intermediat **98**



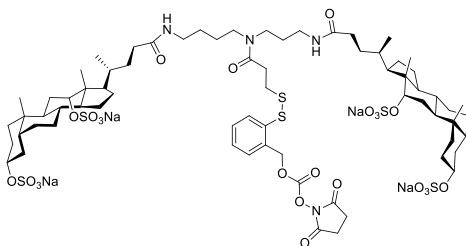
Uwaga! Reakcja prowadzona jest w atmosferze gazu obojętnego – argonu.

W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 100 mg (0.057 mmol) związku **92**, który rozpuszczono w 10 mL bezwodnego *N,N*-dimetyloformamidu.

Następnie do układu wprowadzono 160 μL (1.14 mmol) trietyloaminy oraz 292 mg

(1.14mmol) DSC. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono, stale mieszając, w temperaturze pokojowej na 24h. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostawiając niewielką ilość *N,N*-dimetyloformamidu. Do pozostałość wprowadzono 5 mL acetonu celem wytrącenia surowego produktu **98**. Wytrącony osad odsączono i obficie przemyto acetonem. Otrzymany produkt użyto w kolejnym etapie bez późniejszego oczyszczania.

Intermediat **97**

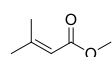


Uwaga! Reakcja prowadzona jest w atmosferze gazu obojętnego – argonu

Pochodną **97** otrzymano analogicznie jak związek **98**. Wychodząc z 110 mg (0.072 mmol) związku **91** i 370 mg (1.44 mmol) DSC otrzymano produkt **97**, który został użyty w kolejnym etapie bez późniejszego oczyszczania.

7.2.6. Synteza układu 'trimethyl lock'

3-metylobut-2-enian metylu **103**

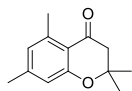


W kolbie kulistej umieszczono 5 g (50 mmol) kwasu 3-metylobut-2-enowego, 50 mL bezwodnego metanolu oraz 1 mL stężonego kwasu siarkowego(VI). Całość ogrzewano do temperatury wrzenia przez 40h. Następnie mieszaninę reakcyjną wylano do 100 mL zimnej wody, przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano eterem dietylowym (3x50 mL). Warstwę eterową przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x100 mL) i wodą (2x100 mL). Warstwę eterową suszono nad bezwodnym siarczanem, magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono. Produkt oczyszczono na drodze destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując 3.10 g (27 mmol, 54%) czystego produktu **103** w postaci bezbarwnej cieczy o tw 45-48°C, 35 Tor (lit.¹⁸⁴ 60°C, 50 Tor).



^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 5.69 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 1.91 (s, 3H).

2,2,5,7-tetrametylochroman-4-on **105**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w nasadkę Dean-Starka i chłodnicę zwrotną umieszczono 20.15 g (0.165 mol) 3,5-dimetylofenolu **102**, 19.54 g (0.170 mol) 3-metylobut-2-enianu metylu **103** oraz 32.34 g (0.17 mol) monohydratu kwasu *p*-toluenosulfonowego, które rozpuszczono w 300 mL toluenu. Mieszaninę utrzymywano w temperaturze wrzenia przez 24 h. Następnie, po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, mieszaninę reakcyjną przemyto wodą (2x200mL), nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x200mL) i ponownie wodą (2x200mL). Frakcję organiczną osuszone nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując pomarańczowy olej. Po krystalizacji z eteru dietylowego, otrzymano 7 g (0.119 mol, 70%) produktu **105** w postaci bezbarwnego, krystalicznego ciała stałego o R_f 0.38 (Hex/AcOEt, 9/1, v/v) i t_t 58-60°C.

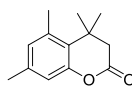
MS-MALDI: m/z obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_2$ 204.1150; znalezione 205.3 $[\text{M}+1]^+$.

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 6.62 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 2.69 (s, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 1.45 (s, 6H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 193.74, 161.01, 145.87, 141.49, 125.1, 116.4, 78.07, 50.22, 26.39, 22.80, 21.41.

FTIR ν [cm^{-1}]: 2900, 1680.

4,4,5,7-tetrametylochroman-2-on **104**



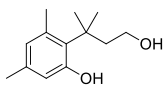
W kolbie kulistej umieszczono 22.21 g (0.18 mol) 3,5-dimetylofenolu **102**, który rozpuszczono w 40 mL kwasu metanosulfonowego. Następnie wprowadzono w jednej porcji 23 g (0.2 mol) estru metylowego kwasu 3-metylobut-2-enowego **103** i pozostawiono stale mieszając w temperaturze 70°C na 18h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej, po czym wylano do 400 mL zimnej wody, a następnie przeniesiono do rozdzielnika i ekstrahowano octanem etylu (3x150 mL). Warstwę organiczną przemyto wodą (3x150 mL), nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (3x150 mL) i ponownie wodą (2x150 mL). Frakcję organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość krystalizowano z etru dietylowego, otrzymując 33.12 g (0.16 mol, 90%) produktu **104** w postaci krystalicznego ciała stałego o t_t 88-91°C (lit. 181 89-90°C) i R_f 0.35 (Hex/AcOEt, 9/1, v/v).

MS-MALDI: m/z obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_2$ 204.1150; znalezione 205.3 $[\text{M}+1]^+$.

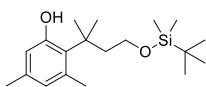
^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm]: 6.78 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 2.65 (s, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 1.34 (s, 6H).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm]: 168.35, 151.79, 137.28, 136.29, 129.46, 127.34, 115.75, 45.00, 35.06, 27.57, 23.00, 20.35.

FTIR ν [cm^{-1}]: 3050, 2900, 1775, 1625, 1575.

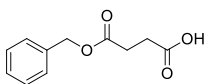
2-(3-hydroksy-1,1-dimetylopropylo)-3,5-dimetylofenol **107**

W kolbie kulistej zaopatrzonej w strzykawkę i chłodnicę zwrotną z rurką z chlorkiem wapnia, sporządzono zawiesinę 4 g (0.104 mol) glinowodoru litu w 100 mL bezwodnego tetrahydrofuranu. Następnie stale mieszając w temperaturze pokojowej wprowadzano małymi porcjami 5.3 g (26 mmol) laktonu **104**. Mieszalinę reakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej na 3h, kontynuując mieszanie. Po tym czasie rozłożono nadmiar glinowodoru litu, po czym odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem powstałe sole nieorganiczne. Przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 100 mL dichlorometanu i osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Po odsączeniu środka suszącego i zatężeniu przesączu, krystaliczną pozostałość oczyszczono poprzez krystalizację z dichlorometanu. Otrzymano 3.47 g (17 mmol, 65%) czystego chromatograficznie produktu **107** w postaci krystalicznego ciała stałego o tt 112-114°C (lit.¹⁸¹ 112-114°C) i R_f 0.27 (Hex/AcOEt, 7/3, v/v).
¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 8.96 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 4.11 (t, 1H), 3.20 (dt, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (t, 2H), 1.44 (s, 6H).
¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 157.42, 137.25, 135.16, 128.95, 125.79, 116.22, 59.59, 45.23, 40.00, 32.34, 25.98, 20.58.

2-[3-[(*O*-*tert*-butylo-dimetylosililo)hydroksy]-1,1-dimetylopropylo]-3,5-dimetylofenol **108**

Uwaga! Reakcja prowadzona jest w atmosferze gazu obojętnego – argonu

W kolbie kulistej zaopatrzonej w strzykawkę, i chłodnicę zwrotną umieszczono 250 mg (1.2 mmol) fenolu **107** i 244 mg (2 mmol) DMAP, które rozpuszczono w 10 mL bezwodnego dichlorometanu. Następnie chłodząc w lodzie i stale mieszając wkroplono roztwór 217 mg (1.44 mmol) TBDMSCl w 10 mL bezwodnego dichlorometanu. Po wkropleniu całej objętości mieszaninę reakcyjną pozostawiono stale mieszając w łaźni lodowej na 2h, a następnie w temperaturze pokojowej na 3 h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przemyto wodą (2x10 mL), następnie 5% roztworem wodorowęglanu sodu (3x10 mL) i ponownie wodą (2x10 mL). Frakcję organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Krystaliczną pozostałość rekrystalizowano z dichlorometanu, otrzymując czysty chromatograficznie produkt **108** w postaci białego ciała stałego w ilości 400 mg (1.2 mmol, 100%) o tt 106-109°C i R_f 0.52 (Hex/AcOEt, 9/1, v/v).
¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 8.99 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 3.39 (t, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.09 (t, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.42 (s, 6H), 0.79 (s, 9H), -0.08 (s, 6H).
¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 157.25, 137.27, 134.91, 128.29, 125.93, 115.85, 61.50, 45.50, 32.37, 26.44, 25.86, 20.68, 18.15, -4.71.
FTIR ν[cm⁻¹]: 3450, 3050, 2900, 1600, 1550.

Wodorobursztynian benzylu **100**

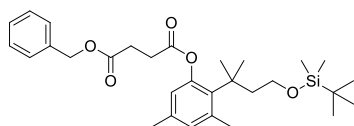
W kolbie kulistej umieszczono 1 g (10 mmol) bezwodnika bursztynowego **99** oraz 1.02 g (8.3 mmol) DMAP, które rozpuszczono w 30 mL dichlorometanu. Następnie wprowadzono w jednej porcji



897 mg (8.3 mmol) alkoholu benzyloвого. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono, stale mieszając, w temperaturze pokojowej na 24 h. Następnie do mieszaniny poreakcyjnej wprowadzono 50 mL 5% roztworu węglanu sodu i pozostawiono intensywnie mieszając na 10 min. Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza, rozdzielono klarowne frakcje, a warstwę wodną zakwaszono 1M HCl do pH ~1-2 i ekstrahowano octanem etylu (3x50 mL). Frakcję organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono, otrzymując surowy produkt w postaci mętnego oleju krystalizującego po ochłodzeniu. Produkt rekrytalizowano z mieszaniny octan etylu/heksan, otrzymując 1.43 g (6.84 mmol, 82%) produktu **100** w postaci białego, połyskującego ciała stałego o tt 55-58°C. (lit.¹⁸⁵ 56-57°C)

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 7.36 (m, 5H), 5.16 (s, 2H), 2.70 (m, 4H).

Bursztynian benzyloво-2-[3-(*O*-*tert*-butyloдимetylosililo)hydroksy-1,1-dimetylopropylo]-3,5-dimetylofenyloво **109**

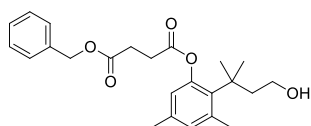


W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną zabezpieczoną przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia oraz wkraplacz, umieszczono 4.47 g (21.5 mmol) monoestru benzyloвого kwasu bursztynowego **100**, 4.62 g (14.33 mmol) sililowej pochodnej fenolu **108** i 200 mg DMAP, które rozpuszczono w 100 mL bezwodnego dichlorometanu. Następnie roztwór ochłodzono w łaźni lodowej do temperatury około 0°C i wkroplono 5.77 g (27.95 mmol) DCC rozpuszczonego w 50 mL bezwodnego dichlorometanu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono, stale mieszając, w temperaturze pokojowej na 48h. Następnie odsączono wytrącony osad DCU, a przesącz przemyto wodą (2x100 mL), nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x100 mL), 5% roztworem wodorosiarczanu sodu (2x100 mL) i ponownie wodą (2x100 mL). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu rzemionkowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników Hex/AcOEt, 9/1, v/v, otrzymując 6.24 g (12.17 mmol, 85%) produktu **109** w postaci oleju o R_f 0.52 (Hex/AcOEt, 9/1, v/v).

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 7.37 (m, 5H), 6.81 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.49 (t, 2H), 2.89 (t, 2H), 2.80 (t, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.04 (t, 2H), 1.48 (s, 6H), 0.86 (s, 9H), -0.01 (s, 6H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 172.01, 171.10, 149.74, 138.35, 135.85, 135.51, 134.08, 132.49, 128.56, 128.05, 122.69, 66.83, 60.74, 45.99, 38.87, 31.92, 29.98, 28.73, 25.88, 25.14, 20.02, 18.03.

Bursztynian benzyloво-2-(3-hydroksy-1,1-dimetylopropylo)-3,5-dimetylofenyloво **111**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 3.4 g (6.63 mmol) pochodnej sililowej **109**, którą rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników THF/H₂O/AcOH, 25mL/25mL/75mL. Mieszaninę reakcyjną mieszano, w temperaturze pokojowej przez 4h. Następnie odparowano rozpuszczalniki,

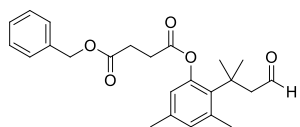


a pozostałość rozpuszczono w 50 mL octanu etylu i przemyto wodą (2x20 mL), nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x20 mL) i ponownie wodą (20 mL). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zateżono. Surowy produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników Hex/AcOEt, 7/3, v/v. Otrzymano 2.39 g (6 mmol, 90%) produktu **111** w postaci jasnego oleju o R_f 0.44 (Hex/AcOEt, 7/3, v/v).

^1H NMR (DMSO- d_6) δ [ppm]: 7.36 (m, 5H), 6.84 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.12 (brs, 1H), 3.21 (t, 2H), 2.84 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.91 (t, 2H), 1.38 (s, 6H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ [ppm]: 172.21, 171.55, 149.86, 138.39, 136.53, 135.49, 134.51, 132.10, 128.82, 128.33, 123.36, 66.20, 58.66, 45.88, 38.88, 32.05, 30.14, 28.77, 25.22, 19.92.

Bursztynian benzylowo-2-(3-okso-1,1-dimetylopropylo)-3,5-dimetylofenylowy **113**



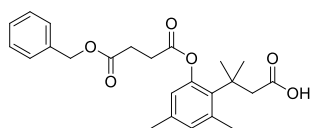
Uwaga! Reakcja prowadzona jest w atmosferze gazu obojętnego – argonu

W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 229 mg (0.57 mmol) alkoholu **111**, który rozpuszczono w 10 mL bezwodnego dichlorometanu. Następnie wprowadzono w jednej porcji 246 mg (1.14 mmol) PCC. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 3h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną naniesiono na cienką warstwę żelu krzemionkowego, a produkt wymyto mieszaniną rozpuszczalników Hex/AcOEt, 7/3, v/v. Po odparowaniu rozpuszczalników otrzymano 186 mg (0.47 mmol, 82%) produktu **113** w postaci żółtego oleju o R_f 0.71 (Hex/AcOEt, 7/3 v/v).

^1H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 9.55 (t, 1H), 7.37 (m, 5H), 6.87 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 2.91 (m, 2H), 2.83 (m, 4H), 2.56 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 1.57 (s, 6H).

^{13}C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 202.77, 171.88, 171.02, 149.14, 138.13, 136.63, 135.70, 132.77, 132.56, 128.55, 128.34, 123.41, 66.42, 56.41, 37.82, 31.60, 29.60, 28.67, 25.10, 20.45.

kwas 3-[2-[O-(4-benzyloksusukcynoilo)]hydroksy-4,6-dimetylo}fenylo-3-metylobutanowy **115**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i strzykawkę, umieszczono 4.79 g (12. mmol) aldehydu **113**, który rozpuszczono w 12 mL acetonitrylu i 6 mL wody.

Następnie do mieszaniny wprowadzono 450 mg (3.26 mmol) diwodorofosforanu sodu i 1.8 mL 50% nadtlenu wodoru. Mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej do temperatury 0°C i powoli, wkroplano 2.71 g (24 mmol) chloranu(III) sodu rozpuszczonego w 18 mL wody, utrzymując temperaturę 0°C. Następnie mieszaninę reakcyjną mieszano przez 3h w tej samej temperaturze. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury pokojowej i powoli wkroplono 30 mL nasyconego roztworu tiosiarczanu sodu celem rozłożenia pozostałości nadtlenu wodoru oraz chloranu(III) sodu. Mieszaninę reakcyjną zakwaszono 3M HCl do pH 1-2 i ekstrahowano octanem etylu

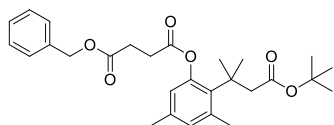


(3x150mL). Warstwę organiczną przemyto solanką (2x200 mL), osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników Hex/AcOEt/AcOH, 70/30/1, v/v/v. Otrzymano 4 g (9.7 mmol, 80%) produktu **115** w postaci żółtawego oleju o R_f 0.29 (Hex/AcOEt, 7/3, v/v).

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 7.35 (m, 5H), 6.82 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.17 (s, 2H), 2.90 (t, 2H), 2.84 (s, 2H), 2.80 (t, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.57 (s, 6H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 177.26, 172.11, 171.37, 149.38, 138.11, 136.33, 135.59, 133.24, 132.38, 128.43, 128.26, 122.71, 66.72, 47.60, 38.61, 31.28, 29.85, 28.76, 25.21, 20.18.

3-{2-[*O*-(4-benzyloksusukcynoilo)]hydroksy-4,6-dimetylo}fenylo-3-metylobutanian *tert*-butylu **117**



W kolbie kulistej umieszczono 200 mg (0.48 mmol) kwasu **115**, który rozpuszczono w 3 mL octanu *tert*-butylu.

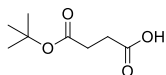
Następnie do mieszaniny wprowadzono 70 μL 72% kwasu nadchlorowego, po czym kolbę reakcyjną szczelnie zamknięto i mieszano w temperaturze pokojowej przez 72h. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 10 ml octanu etylu i przemyto 10 mL wody, następnie nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x 10mL) i ponownie 10 mL wody. Frakcję organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono. Pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników Hex/AcOEt, 7/3, v/v. Otrzymano 74 mg (0.16 mmol, 33%) produktu **117** w postaci żółtawego oleju o R_f 0.85 (Hex/AcOEt, 7/3, v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_6$ 468.2512; znalezione 469.2548 $[\text{M}+1]^+$.

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 7.35 (m, 5H), 6.82 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 2.92 (t, 2H), 2.82 (t, 2H), 2.73 (s, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.56 (s, 6H), 1.29 (s, 9H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 171.96, 171.28, 171.13, 149.46, 138, 136.04, 135.70, 133.54, 132.23, 128.57, 128.26, 122.86, 79.76, 66.51, 49.29, 39.15, 31.46, 30.07, 28.81, 27.75, 25.30, 20.13.

Wodorobursztynian *tert*-butylu **101**



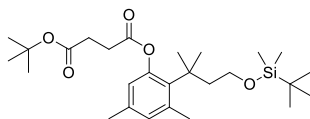
W kolbie kulistej umieszczono 25.37 g (0.25 mol) bezwodnika bursztynowego **99**, 8.46 g (0.073 mol) NHS oraz 2.96 g (24 mmol) DMAP, które zawieszono w 400 mL toluenu. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 42.3 mL (0.45 mol) *tert*-butanolu oraz 10.58 mL (76 mmol) bezwodnej trietyloaminy. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w łaźni olejowej i stale mieszając, doprowadzono do wrzenia. Mieszaninę pozostawiono w temperaturze wrzenia na 24h. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano 400 mL octanu etylu celem rozcieńczenia mieszaniny, a następnie przemyto 0.1 M HCl (4x500 mL) oraz nasyconym roztworem chlorku sodu (3x500 mL). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym

ciśnieniem uzyskując brązowy olej, który poddano krystalizacji z eteru dietylowego i heksanu otrzymując beżowe ciało stałe. W wyniku ponownej rekrystalizacji z mieszaniny octan etylu/hexan, otrzymano 21.1 g (0.12 mol, 48%) produktu **101** w postaci krystalicznego, białego ciała stałego o t_f 42-44°C (lit.¹⁸⁵ 44-45°C).

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 12.13 (s, 1H), 2.38 (s, 4H), 1.39 (s, 9H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 173.67, 171.88, 80.08, 30.24, 29.10, 27.31.

Bursztynian *tert*-butylowo-[2-[3-(*O*-*tert*-butylodimetylosililo)hydroksy-1,1-dimetylopropylo]-3,5-dimetylo}fenylowy **110**



Pochodną **110** otrzymano analogicznie jak związek **109**.

Wychodząc z 810 mg (4.65 mmol) wodorobursztynianu *tert*-butylu **101**, 1 g (3.1 mmol) fenolu **108** oraz 400 mg DMAP otrzymano 1.41 g (2.94 mmol, 95%) produktu **110** w

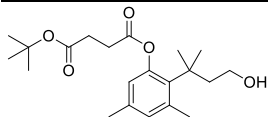
postaci oleju o R_f 0.52 (Hex/AcOEt, 9/1, v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₂₇H₄₆O₅Si 478.3115; znalezione 379.3251 [M+1]⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 6.82 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 3.42 (t, 2H), 2.75 (t, 2H), 2.56 (t, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.17 (s, 2H), 1.96 (t, 2H), 1.41 (s, 6H), 1.39 (s, 9H), 0.81 (s, 9H), -0.06 (s, 6H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 171.74, 171.44, 150.06, 138.24, 135.58, 134.00, 132.25, 123.37, 80.45, 60.83, 46.02, 39.17, 32.05, 30.07, 28.15, 26.23, 25.15, 20.01, 18.08, -4.87.

Bursztynian *tert*-butylowo -2-(3-hydroksy-1,1-dimetylopropylo)-3,5-dimetylofenylowy **112**



Pochodną **112** otrzymano analogicznie jak związek **111**.

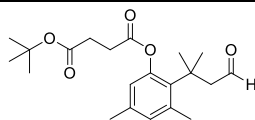
Wychodząc z 204 mg (0.43 mmol) związku **110**, otrzymano 112 mg (0.31 mmol, 72%) produktu **112** w postaci jasnego oleju o R_f 0.41 (Hex/AcOEt, 7/3, v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₂₁H₃₂O₅ 364.225; znalezione 365.2580 [M+1]⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 6.81 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 4.20 (t, 1H), 3.20 (dt, 2H), 2.76 (t, 2H), 2.55 (t, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.90 (t, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.39 (s, 6H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 171.25, 170.92, 149.28, 137.73, 135.04, 133.79, 131.55, 122.79, 79.78, 58.06, 45.43, 38.41, 31.30, 29.68, 27.48, 24.58, 19.37.

Bursztynian *tert*-butylowo-2-(3-okso-1,1-dimetylopropylo)-3,5-dimetylo}fenylowy **114**



Pochodną **114** otrzymano analogicznie jak związek **113**.

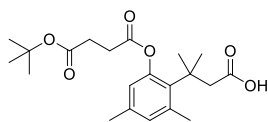
Wychodząc z 429 mg (1.18 mmol) alkoholu **112** i 520 mg (2.36 mmol) PCC, otrzymano 362 mg (1 mmol, 85%) produktu **114** w postaci żółtawego oleju o R_f 0.33 (Hex/AcOEt, 9/1, v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₂₁H₃₀O₅ 362.209; znalezione 363.2430 [M+1]⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 9.44 (t, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 2.88 (d, 2H), 2.77 (t, 2H), 2.55 (t, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.47 (s, 6H), 1.38 (s, 9H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ[ppm]: 202.74, 171.99, 171.61, 149.60, 138.10, 136.12, 133.51, 132.17, 123.56, 80.59, 56.31, 37.96, 31.40, 30.10, 28.09, 25.19, 19.90.

kwas 3-{2-[*O*-(4-*tert*-butyloksysukcynoilo)]hydroksy-4,6-dimetylo}fenylo-3-metylobutanowy **116**



Pochodną **116** otrzymano analogicznie jak związek **115**.

Wychodząc z 1.46 g (3.68 mmol) aldehydu **114**, 125 mg (1 mmol) diwodorofosforanu sodu, 1 mL 50% nadtlenu wodoru i 833 mg (7,36 mmol) chloranu(III) sodu, otrzymano 1.09 g (2.88 mmol,

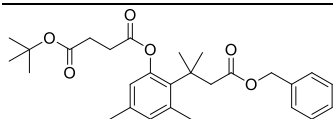
78%) produktu **116** w postaci żółtawego oleju o R_f 0.46 (Hex/AcOEt/AcOH, 70/30/1, v/v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{21}H_{30}O_6$ 378.204; znalezione 379.2370 $[M+1]^+$.

1H NMR (DMSO- d_6) δ [ppm]: 11.79 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 2.78 (t, 2H), 2.71 (s, 2H), 2.58 (t, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.48 (s, 6H), 1.41 (s, 9H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ [ppm]: 173.10, 171.82, 171.56, 149.74, 138.00, 135.70, 134.25, 132.00, 123.17, 80.51, 48.14, 38.45, 31.26, 30.21, 28.36, 25.26, 20.12.

3-{2-[*O*-(4-*tert*-butyloksysukcynoilo)]hydroksy-4,6-dimetylo}fenylo-3-metylobutanian benzylu **118**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i strzykawkę, zabezpieczoną przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono 1 g (2.64 mmol) kwasu **116**, który rozpuszczono w 20 mL bezwodnego

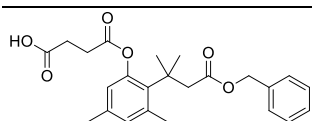
N,N-dimetyloformamidu. Następnie do mieszaniny wprowadzono 529 mg (5.28 mmol) wodorowęglanu potasu i pozostawiono stale mieszając w temperaturze pokojowej na 15 min. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono w jednej porcji 476 μ L (4 mmol) bromku benzylu i ponownie mieszano przez 3h w temperaturze 40°C. Po tym czasie do mieszaniny wprowadzono 30 mL 5% roztworu wodorowęglanu sodu i ekstrahowano octanem etylu (3x50mL). Frakcję organiczną przemyto następnie 5% roztworem wodorowęglanu sodu (2x50mL) i solanką (2x50mL). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, przesącz zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników Hex/AcOEt, 8/2, v/v. Otrzymano 1 g (2.13 mmol, 81%) produktu **118** w postaci żółtawego oleju o R_f 0.37 (Hex/AcOEt, 9/1, v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{28}H_{36}O_6$ 468.251; znalezione 469.2840 $[M+1]^+$.

1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 7.33 (m, 3H), 7.23 (m, 2H), 6.80 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 2.93 (s, 2H), 2.81 (t, 2H), 2.64 (t, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 1.59 (s, 6H), 1.49 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 171.61, 171.55, 171.31, 149.50, 139.97, 136.16, 136.02, 133.38, 132.41, 128.39, 128.24, 127.98, 123.00, 80.71, 65.92, 48.04, 38.96, 31.40, 30.15, 27.92, 25.42, 20.29.

3-[2-(*O*-sukcynoilo)hydroksy-4,6-dimetylo]fenylo-3-metylobutanian benzylu **119**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, zabezpieczoną przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono 1 g (2.13 mmol) estru **118**, który rozpuszczono w 20 mL mieszaniny rozpuszczalników



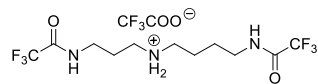
dichlorometan/kwas trifluorooctowy, 3/1, v/v. Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez 1h. Następnie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników Hex/AcOEt/AcOH, 70/30/1, v/v/v. Otrzymano 820 mg (2 mmol, 94%) produktu **119** w postaci jasnożółtego oleju.

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{24}H_{28}O_6$ 412.189; znalezione 413.1950 $[M+1]^+$.

1H NMR (DMSO- d_6) δ [ppm]: 12.34 (brs, 1H), 7.31 (m, 3H), 7.18 (m, 2H), 6.79 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 4.95 (s, 2H), 2.90 (s, 2H), 2.74 (t, 2H), 2.56 (t, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 1.47 (s, 6H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ [ppm]: 173.90, 172.07, 171.42, 150.10, 138.06, 136.81, 135.77, 134.13, 132.30, 128.71, 128.25, 123.30, 65.52, 47.73, 38.83, 31.37, 30.33, 28.89, 25.36, 20.19.

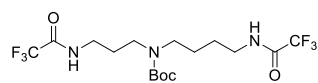
Trifluoroctan N^1, N^7 -bis(trifluoroacetylo)spermidyny **122**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i strzykawkę, umieszczono 2.24 g (15.42 mmol) spermidyny **7**, którą rozpuszczono w 15 mL acetonitrylu. Następnie stale mieszając wkroplono 6 mL (50.42 mmol) trifluoroctanu etylu i 333 μ L (18.5 mmol) wody destylowanej. Mieszaninę mieszano w temperaturze wrzenia przez 4h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej, odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość, w postaci białego ciała stałego, krystalizowano z octanu etylu. Otrzymano 6.12 g (13.56 mmol, 88%) produktu **122** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.60 (DCM/MeOH, 8/2, v/v) i t_t 140-143°C (lit.¹⁸³ 145-146°C).

1H NMR (DMSO- d_6) δ [ppm]: 9.65-9.46 (m, 2H), 8.50 (brs, 2H), 3.33-3.14 (m, 4H), 2.92 (m, 4H), 1.82 (q_i , 2H), 1.56 (m, 4H).

N^3 -*tert*-butoksykarbonylo- N^1, N^7 -bis(trifluoroacetylo)spermidyna **123**

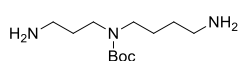


W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i strzykawkę, umieszczono 12.79 g (28.34 mmol) soli spermidyny **122**, którą zawieszono w 75 mL tetrahydrofuranu. Następnie wprowadzono 12 mL (86 mmol) trietyloaminy i pozostawiono stale mieszając w temperaturze pokojowej do momentu całkowitego rozpuszczenia się soli spermidyny. Następnie mieszaninę ochłodzono do temperatury 0°C i wkroplono roztwór 6.8 g (31.17 mmol) Boc₂O w 20 mL tetrahydrofuranu. Mieszaninę mieszano w temperaturze pokojowej przez 24h. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 200 mL octanu etylu. Roztwór przemyto wodą (3x100 mL), frakcję organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono. Pozostałość krystalizowano z mieszaniny eter dietylowy/heksan, otrzymując 11.43 g (26.13 mmol, 92%) produktu **123** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.65 (Hex/AcOEt, 1/1, v/v) i t_t 73-75°C (lit.¹⁸³ 74-75°C).

1H NMR (DMSO- d_6) δ [ppm]: 9.42 (m, 2H), 3.23-3.06 (m, 8H), 1.68 (q_i , 2H), 1.43 (m, 4H), 1.37 (s, 9H).



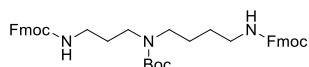
N^3 -*tert*-butoksykarbonylospermidyna **124**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, strzykawkę i termometr umieszczono 1 g (2.3 mmol) N^3 -Boc-spermidyny **123**, którą rozpuszczono w 30 mL metanolu. Następnie mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej do temperatury 10°C i rozpoczęto wkraplanie 25 mL 0.2 M wodnego roztworu wodorotlenku sodu, stale utrzymując temperaturę 10°C. Po wkropleniu całej objętości roztworu, mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez 24h. Po tym czasie odparowano metanol pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostały roztwór wodny ekstrahowano mieszaniną rozpuszczalników $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9/1, v/v (4x20 mL). Frakcje organiczne połączono i osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, środek suszący odsączono, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 590 mg (2.2 mmol, 96%) produktu **124** w postaci jasnożółtego oleju.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 3.18-3.01 (m, 4H), 2.51-2.40 (m, 4H), 1.52 (q, 2H), 1.41 (m, 2H), 1.33-1.22 (m, 11H).

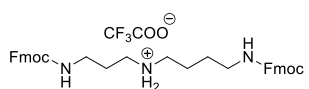
N^3 -*tert*-butoksykarbonylo- N^1, N^7 -bis(9-fluorenylometoksykarbonylo)spermidyna **125**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i rurkę z chlorkiem wapnia, umieszczono 78 mg (0.32 mmol) N^3 -Boc-spermidyny **124**, którą rozpuszczono w 3 mL chloroformu. Następnie wprowadzono w jednej porcji 216 mg (0.64 mmol) Fmoc-NHS, po czym mieszano przez 24h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono dodając 10 mL chloroformu i przemyto wodą (3x10 mL). Frakcję organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników Hex/AcOEt, 7/3, v/v, a następnie zwiększając polarność eluentu do Hex/AcOEt, 1/1, v/v. Otrzymano 208 mg (0.3 mmol, 94%) produktu **125** w postaci mętnego oleju o R_f 0.23 (Hex/AcOEt, 7/3, v/v).

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 7.78 (d, 4H), 7.62 (t, 4H), 7.41 (t, 4H), 7.33 (t, 4H), 4.42 (m, 4H), 4.23 (m, 2H), 3.37-3.07 (m, 8H), 1.82-1.42 (m, 15H).

Trifluoroocetan N^1, N^7 -bis(9-fluorenylometoksykarbonylo)spermidyny **126**

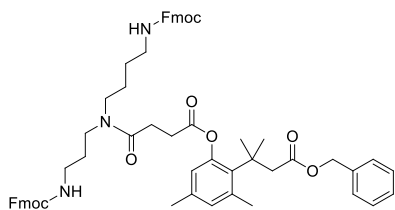


W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 184 mg (0.27 mmol) N^1, N^7 -Fmoc $_2$ - N^3 -Boc-spermidyny **125**, którą rozpuszczono w 3 mL mieszaniny CHCl_3/TFA , 3/1, v/v. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1h w temperaturze pokojowej. Następnie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość zalano eterem dietylowym i ponownie odparowano otrzymując surowy produkt w postaci szarawego ciała stałego. Produkt rekrytalizowano z chloroformu, otrzymując 137 mg (0.2 mmol, 74%) produktu **126** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.34 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 6.2/5/1/0.1, v/v/v i tt 125-128°C).



^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.79 (d, 4H), 7.62 (d, 4H), 7.38 (t, 4H), 7.30 (t, 4H), 4.43-4.31 (m, 4H), 4.19 (m, 2H), 3.21 (t, 2H), 3.15 (t, 2H), 2.96 (m, 4H), 1.83 (q, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.57 (m, 2H).

N^1, N^7 -bis(flourenylometoksykarbonylo)- N^3 -{4-[2-(2-benzylloksykarbonylo-1,1-dimetyloetylo)-3,5-dimetylo]fenyloksy-1,4-dioksobutylo}spemidyna **128**



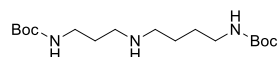
W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, zabezpieczoną przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono 755 mg (1.83 mmol) kwasu **119** oraz 254 mg (2.2 mmol) NHS, które rozpuszczono w 10 mL bezwodnego dichlorometanu. Następnie do mieszaniny wprowadzono 640 mg (3.1 mmol) DCC i mieszano przez 24h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie odsączono osad DCU, przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem i ponownie rozpuszczono w 50 mL chloroformu. Następnie frakcję organiczną przemyto wodą (2x30 mL) i osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Środek suszący odsączono, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną pozostałość poddano dalszym przemianom bez późniejszego oczyszczania.

W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną zabezpieczoną przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono otrzymany ester aktywny **120**, który rozpuszczono w 50 mL bezwodnego dichlorometanu. Następnie do mieszaniny wprowadzono 1.2 mL (6.72 mmol) DIPEA i pozostawiono stale mieszając w temperaturze pokojowej na 10 minut. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 1.56 g (2.22 mmol) trifluorooctanu Fmoc₂-spemidyny **126** i mieszano w temperaturze pokojowej przez około 5 h (w czasie reakcji wytrąca się biały osad, który nie jest pożądanym produktem). Następnie odparowano rozpuszczalniki, a pozostałość rozpuszczono w 50 mL chloroformu. Fazę organiczną przemyto solanką (2x30 mL), 5% roztworem wodorosiarczanu sodu (2x30 mL) i ponownie solanką (2x30 mL), osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników Hex/AcOEt, 4/6, v/v do momentu elucji zanieczyszczeń o R_f większym niż pożądanego produktu; eluent zmieniono na octan etylu wymywając pożądaną produkt. Otrzymano 1 g (1 mmol, 56%) produktu **128** w postaci szklistego oleju o R_f 0.41 (Hex/AcOEt, 4/6, v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{61}\text{H}_{65}\text{N}_3\text{O}_9$ 983.4721; znalezione 984.4758 $[\text{M}+1]^+$.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.78 (d, 4H), 7.61 (m, 4H), 7.38 (t, 4H), 7.31-7.21 (m, 7H), 7.11 (m, 2H), 6.71 (s, 1H), 6.58 (m, 1H), 4.90 (s, 2H), 4.31 (m, 4H), 4.15 (m, 2H), 3.42-3.28 (m, 4H), 3.15-3.03 (m, 4H), 2.92-2.62 (m, 6H), 2.44 (s, 3H), 2.15 (m, 3H), 1.83-1.37 (m, 12H).

N^1, N^7 -bis(*tert*-butoksykarbonylo)spemidyna **127**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, zabezpieczoną przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, oraz strzykawkę umieszczono 1.23 g (8.47 mmol) spemidyny **7**, którą rozpuszczono

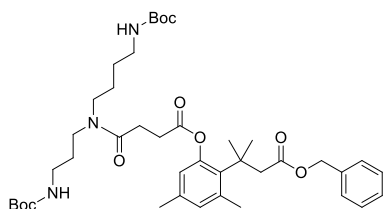


w 50 mL bezwodnego tetrahydrofuranu. Następnie mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej do temperatury 0°C i wkroplono roztwór 4.17 g (16.94 mmol) Boc-ON **121** w 50 mL bezwodnego tetrahydrofuranu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 0°C przez 4h. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 10 mL eteru dietylowego. Eterowy roztwór przemyto nasyconym roztworem NaOH (4x25 mL) do momentu całkowitego zaniku żółtego zabarwienia. Warstwę organiczną osuszone nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Krystaliczną pozostałość rekrystalizowano z eteru dietylowego otrzymując 1.88 g (5.44 mmol, 64%) produktu **127** w postaci białego ciała stałego o t_f 83-85°C (lit.¹⁸⁶ 82-84°C).

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 5.22 (brs, 1H), 4.88 (brs, 1H), 3.21 (m, 2H), 3.14 (m, 2H), 2.67 (t, 2H), 2.61 (t, 2H), 1.65 (q_i, 2H), 1.53 (m, 4H), 1.45 (s, 18H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 156.09, 156.01, 78.94, 49.45, 47.75, 40.53, 39.29, 29.88, 28.44, 27.84, 27.41.

*N*¹,*N*⁷-bis(*tert*-butoksykarbonylo)-*N*³-{4-[2-(2-benzylksoxykarbonylo-1,1-dimetyloetylo)-3,5-dimetylo]fenyloksy-1,4-dioksy}butylospemidyna **132**



W kolbie kulistej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, zabezpieczoną przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono 1 g (2.42 mmol) kwasu **119** oraz 352 mg (3.06 mmol) NHS, które rozpuszczono w 20 mL bezwodnego dichlorometanu. Następnie do mieszaniny wprowadzono 895 mg (4.34 mmol) DCC i mieszano w temperaturze pokojowej przez 24h. Po tym czasie odsączono osad DCU, a przesącz rozcieńczono 50 mL dichlorometanu. Mieszaninę reakcyjną przemyto wodą (2x30 mL), nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2x30 mL) i ponownie wodą (2x30 mL). Frakcję organiczną osuszone nad bezwodnym siarczanem magnezu, środek suszący odsączono, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną pozostałość poddano dalszym przemianom bez późniejszego oczyszczania.

W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną zabezpieczoną przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono otrzymany ester aktywny **120**, który rozpuszczono w 50 mL bezwodnego dichlorometanu. Następnie do mieszaniny wprowadzono kolejno 560 µL (6.72 mmol) DIPEA i 1.1 g (3.2 mmol) Boc₂-spemidyny **127**, po czym mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 5h. Po tym czasie mieszaninę rozcieńczono dodając 20 mL dichlorometanu, po czym przemywano solanką (2x30 mL), 5% roztworem wodorosiarczanu sodu (2x30 mL) i ponownie solanką (2x30 mL). Frakcję organiczną osuszone nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników Hex/AcOEt, 4/6, v/v, otrzymując 1.1 g (1.4 mmol, 68%) produktu **132** w postaci jasnego oleju o R_f 0.50 (Hex/AcOEt, 4/6, v/v).

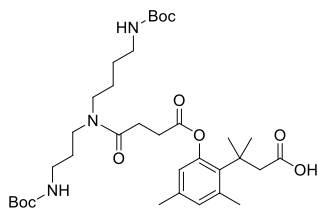
HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₄₁H₆₁N₃O₉ 739.4408; znalezione 740.4537 [M+1]⁺.



^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.29 (m, 3H), 7.16 (m, 2H), 6.79 (s, 1H), 6.63 (m, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.36 (m, 4H), 3.12-2.97 (m, 4H), 2.93 (s, 2H), 2.83 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 1.92-1.36 (m, 30H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 172.47, 172.42, 172.13, 171.88, 171.72, 157.11, 156.95, 149.70, 137.80, 136.08, 135.83, 133.14, 131.74, 127.97, 127.82, 127.57, 122.73, 78.09, 65.49, 45.49, 45.23, 43.08, 39.60, 39.35, 38.77, 37.39, 37.19, 33.40, 30.87, 29.91, 28.72, 27.38, 26.87, 25.48, 25.36, 24.66, 24.55, 24.16, 18.95.

N^1, N^7 -bis(*tert*-butoksykarbonylo)- N^3 -{4-(2-[(2-karboksy-1,1-dimetyloetylo)-3,5-dimetylo]fenyloksy-1,4-dioksy)butylo}spiermidyna **133**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w balon z wodorem umieszczono 1.21 g (1.64 mmol) estru benzyłowego **132**, który rozpuszczono w 30 mL tetrahydrofuranu. Następnie do mieszaniny wprowadzono 500 mg 10% Pd/C. a układ przepłukano wodorem, po czym mieszano w temperaturze pokojowej i atmosferze wodoru przez 4h. Po tym czasie katalizator odsączono przez ciekłą warstwę celitu, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując 918 mg (1.41 mmol, 86%) produktu **133** w postaci szklatego oleju o R_f 0.73 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65/10/1, v/v/v.

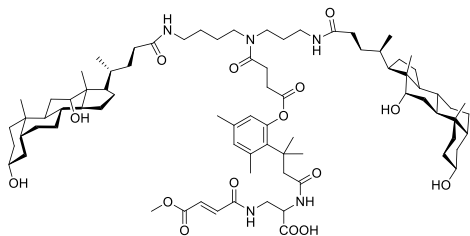
HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_9$ 649.3938; znalezione 650.3858 $[\text{M}+1]^+$.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 6.82 (s, 1H), 6.61 (m, 1H), 3.38 (m, 4H), 3.09 (m, 2H), 3.01 (m, 2H), 2.87 (m, 2H), 2.84 (s, 2H), 2.80 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.90-1.28 (m, 30H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 174.05, 172.56, 172.51, 172.20, 171.80, 149.62, 137.85, 135.69, 133.66, 131.66, 122.66, 78.12, 47.35, 45.39, 45.17, 43.07, 39.55, 39.36, 38.39, 37.38, 37.23, 33.34, 30.64, 29.95, 27.56, 27.40, 26.84, 25.49, 25.33, 24.68, 24.55, 24.18, 18.91.

7.2.7. Synteza koniugatów parasoli molekularnych z FMDP, *cis*-pentacyną i Lys(Mca) z wykorzystaniem łącznika 'trimethyl lock'

Koniugat parasola deoksycholowego z łącznikiem 'trimethyl lock' i FMDP **142**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i zabezpieczonej przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono 172 mg (0,26 mmol) kwasu **133**, który rozpuszczono w 5 mL bezwodnego N,N -dimetyloformamidu. Następnie do mieszaniny wprowadzono 100 μL DIPEA i 91 mg (0.26 mmol) TDBTU. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 20 min. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono kolejne 100 μL DIPEA, a następnie 66 mg (0.26 mmol) chlorowodorku FMDP **1**. Mieszaninę reakcyjną dalej mieszano w temperaturze pokojowej przez kolejne 24h. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczano na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników



$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65/10/1, v/v/v, a następnie zwiększając polarność układu poprzez zmianę w składzie eluentu $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 7/4/1 v/v/v. Otrzymano 203 mg (maksymalnie 0.208 mmol, ~80%) produktu **135**.

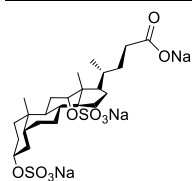
W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i zabezpieczonej przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono 203 mg (maksymalnie 0.208 mmol) otrzymanego wcześniej koniugatu **135**, który rozpuszczono w 8 mL mieszaniny $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$, 3/1, v/v i mieszano w temperaturze pokojowej przez 1h. Następnie rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując 182 mg (maksymalnie 0.208 mmol) surowego produktu **138** w postaci oleju.

W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i zabezpieczonej przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia umieszczono 149 mg (0.38 mmol) kwasu deoksycholowego **5**, który rozpuszczono w 10 mL bezwodnego *N,N*-dimetyloformamidu. Następnie do mieszaniny wprowadzono 150 μL DIPEA (0.86 mmol) oraz 133 mg (0.38 mmol) TDBTU. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 20 min. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 400 μL DIPEA (2.29 mmol) oraz otrzymaną wcześniej sól trifluorooctanową koniugatu FMDP ze spermidyną **138**. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 15h. Po tym czasie rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65/10/1, v/v/v, a następnie $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 7/3, v/v. Otrzymano 100 mg (0.07 mmol, 28%) produktu **142** w postaci jasnożółtego ciała stałego.

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{80}\text{H}_{125}\text{N}_5\text{O}_{15}$ 1395.9172; znalezione 1396.9149 $[\text{M}+1]^+$.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 6.89 (dd, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.69 (d, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.29 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.59-3.32 (m, 8H), 3.19 (m, 4H), 2.96 (m, 2H), 2.88 (m, 1H), 2.83 (m, 2H), 2.60 (m, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.24 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.10 (m, 2H), 1.95-0.83 (m, 72H), 0.70 (s, 6H).

O,O'-bis(siarczano)deoksycholan trisodowy **143**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i zabezpieczonej przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, umieszczono 1 g (2.55 mmol) kwasu deoksycholowego **5**, który rozpuszczono w 10 mL bezwodnego *N,N*-dimetyloformamidu. Następnie do roztworu wprowadzono w jednej porcji 7.32 g (46 mmol) kompleksu Py/SO_3 i mieszano w temperaturze pokojowej przez 24h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną zobojętniono wodnym roztworem wodorowęglanu sodu do pH ~8. Następnie rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość zawieszono w 100 mL metanolu i odsączono nierozpuszczalne sole nieorganiczne. Przesącz zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w niewielkiej ilości *N,N*-dimetyloformamidu, po czym potraktowano acetonitrylem celem precypitacji surowego produktu. Osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, ponownie rozpuszczono w niewielkiej ilości *N,N*-dimetyloformamidu i powtórzono wytrącanie produktu acetonitrylem. Uzyskany osad odsączono i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem.

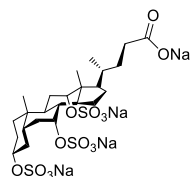


Otrzymano 1.55 g (2.5 mmol, 98%) produktu **143** w postaci jasnobieżowego ciała stałego o R_f 0.39 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 7/4/1, v/v/v i tt 202-204°C.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 4.86 (s, 1H), 4.26 (m, 1H), 2.36-2.20 (m, 2H), 2.08 (m, 1H), 2.00-1.71 (m, 10H), 1.69-1.54 (m, 2H), 1.54-1.23 (m, 8H), 1.23-0.90 (m, 9H), 0.76 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 182.28, 81.21, 79.15, 45.99, 42.35, 36.06, 35.93, 35.60, 35.36, 35.14, 34.00, 33.62, 33.30, 32.56, 30.23, 28.95, 27.34, 27.05, 26.05, 24.68, 23.49, 22.30, 16.95, 11.61.

O,O',O''-tris(siarczano)chololan tetrasodowy **144**

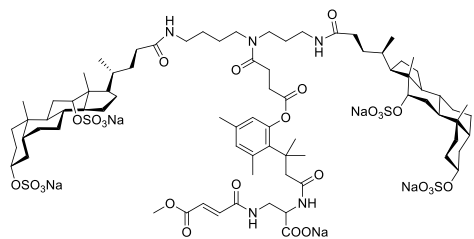


Związek **144** otrzymano analogicznie jak pochodną **143**. Wychodząc z 1 g (2.45 mmol) kwasu cholowego **6** i 10.5 g (66 mmol) kompleksu Py/SO_3 , otrzymano 1.49 g (2 mmol, 82%) produktu **144** w postaci jasnobieżowego ciała stałego.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 4.68 (s, 1H), 4.46 (s, 1H), 4.15 (m, 1H), 2.52-2.21 (m, 5H), 2.18-1.62 (m, 12H), 1.50-1.22 (m, 5H), 1.17-0.90 (m, 8H), 0.78 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 182.48, 81.06, 79.52, 76.71, 45.90, 42.19, 42.05, 39.34, 36.19, 35.69, 35.39, 35.10, 34.14, 32.49, 30.30, 29.10, 27.59, 27.44, 27.27, 24.55, 22.52, 21.82, 17.01, 11.61.

Koniugat zestryfikowanego tritlenkiem siarki parasola deoksycholowego z FMDP w postaci soli sodowej **14**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i zabezpieczonej przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia umieszczono 285 mg (0.46 mmol) soli kwasu deoksycholowego **143**, którą rozpuszczono w 5 mL bezwodnego *N,N*-dimetyloformamidu. Następnie do mieszaniny wprowadzono

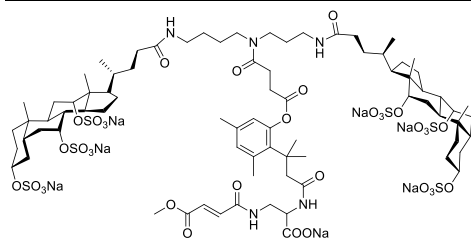
100 μL (0.57 mmol) DIPEA oraz 161 mg (0.46 mmol) TDBTU. Mieszaninę pozostawiono w temperaturze pokojowej na 1h, stale mieszając. Po tym czasie do mieszaniny dodano 300 μL (1.71 mmol) DIPEA, po czym wkroplono roztwór 200 mg (0.23 mmol) surowego produktu **138**, rozpuszczonego w minimalnej objętości bezwodnego *N,N*-dimetyloformamidu, około 5 mL. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24h. Następnie odparowano większość *N,N*-dimetyloformamidu pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostawiając jego niewielką objętość. Do roztworu wprowadzano acetonitryl, do momentu całkowitej precypitacji surowego produktu. Osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 7/4/1, v/v/v. Otrzymano 170 mg (0.094 mmol, ~50%) produktu **14** w postaci jasnego ciała stałego o R_f 0.29 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 7/4/1, v/v/v) i tt ~190°C (rozkład).



^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 6.96 (m, 1H), 6.80 (m, 1H), 6.76 (d, 1H), 6.67 (s, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.28 (m, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.64-3.39 (m, 6H), 3.29-3.12 (m, 4H), 3.07-2.61 (m, 6H), 2.56 (s, 3H), 2.35-2.07 (m, 7H), 2.01-0.88 (m, 72H), 0.75 (s, 6H).

^{13}C NMR (D_2O) δ [ppm]: 176.84, 175.74, 174.22, 173.54, 172.70, 172.30, 167.19, 165.69, 149.57, 136.71, 136.16, 129.55, 118.96, 82.73, 80.69, 52.72, 48.28, 45.64, 41.64, 39.35, 35.71, 35.19, 34.59, 33.59, 33.31, 32.92, 31.50, 27.48, 26.97, 25.79, 25.02, 22.64, 19.68, 16.89, 12.07, 0.74.

Koniugat zestryfikowanego trójtlenkiem siarki parasola cholowego z FMDP w postaci soli sodowej **15**



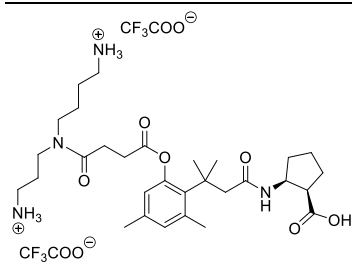
Pochodną **15** otrzymano analogicznie jak związek **14**. Wychodząc z 340 mg (0.46 mmol) soli kwasu cholowego **144**, 161 mg (0.46 mmol) TDBTU oraz 200 mg (maksymalnie 0.23 mmol) surowego produktu **138**, otrzymano 137 mg (0.07 mmol, ~30%) produktu **15** w postaci jasnego ciała stałego

o R_f 0.14 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 7/4/1, v/v/v).

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 6.96 (m, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.74 (d, 1H), 6.64 (s, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.13 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.61-3.36 (m, 6H), 3.27-3.11 (m, 4H), 3.01-2.74 (m, 6H), 2.55 (s, 3H), 2.45-2.20 (m, 10H), 2.20-1.14 (m, 49H), 1.13-0.85 (m, 16H), 0.74 (s, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.51, 173.43, 172.62, 172.25, 171.99, 165.95, 164.97, 163.54, 149.80, 138.03, 136.44, 135.79, 133.81, 131.84, 129.27, 122.69, 81.07, 79.68, 76.65, 53.66, 51.45, 45.93, 42.26, 41.93, 39.10, 35.70, 35.43, 34.95, 34.13, 32.67, 31.83, 31.28, 30.95, 30.18, 29.01, 27.64, 27.35, 26.31, 24.65, 24.46, 22.45, 21.76, 19.00, 16.92, 11.49.

Koniugat trifluorooctanu spermidyny z łącznikiem 'trimethyl lock' i *cis*-pentacyną **139**



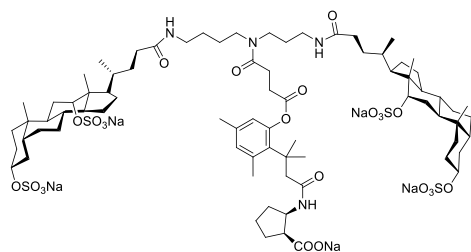
Związek **136** otrzymano analogicznie do **135**. Wychodząc z 700 mg (1.1 mmol) kwasu **133**, 400 μL DIPEA, 384 mg (1.1 mmol) TDBTU i 142 mg (1.1 mmol) *cis*-pentacycyny **2**, otrzymano 790 mg (maksymalnie 0.89 mmol, ~81%) produktu **136** o R_f 0.70 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65/10/1, v/v/v).

Pochodną **139** otrzymano analogicznie jak związek **138**. Wychodząc z 790 mg (maksymalnie 0.89 mmol) związku **136** otrzymano 700 mg (maksymalnie 0.89 mmol) surowego produktu **139** w postaci oleju, który poddano kolejnym przemianom bez dalszego oczyszczania.

Koniugat zestryfikowanego tritlenkiem siarki parasola deoksycholowego z *cis*-pentacyną w postaci soli sodowej **16**

Pochodną **16** otrzymano analogicznie jak związek **14**. Wychodząc z 680 mg (1.1 mmol) soli kwasu deoksycholowego **143**, 384 mg (1.1 mmol) TDBTU oraz 438 mg (maksymalnie



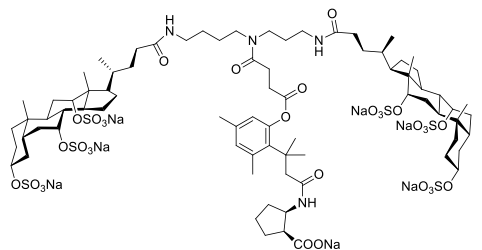


0.55 mmol) surowego produktu **139**, otrzymano 316 mg (0.18 mmol, ~33%) produktu **16** w postaci białego ciała stałego o R_f 0.32 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 7/4/1, v/v/v).

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 6.82 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.28 (m, 3H), 3.44 (m, 4H), 3.21 (m, 4H), 2.96 (m, 3H), 2.83

(m, 4H), 2.71 (m, 1H), 2.60-4.42 (m, 4H), 2.36-2.07 (m, 9H), 2.01-0.86 (m, 74H), 0.76 (s, 6H).
 ^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.77, 175.53, 173.31, 172.39, 172.03, 163.52, 150.07, 138.06, 136.20, 133.59, 131.90, 122.96, 81.21, 79.37, 52.15, 48.51, 45.91, 45.36, 43.55, 42.31, 39.66, 38.50, 36.73, 36.52, 35.81, 35.15, 33.91, 33.63, 33.30, 32.64, 31.69, 31.26, 30.07, 27.54, 27.28, 27.16, 27.00, 26.67, 26.24, 26.07, 25.66, 24.77, 24.59, 23.51, 22.30, 21.46, 18.89, 16.83, 11.59.

Koniugat zestyfikowanego tritlenkiem siarki parasola cholowego z *cis*-pentacyną w postaci soli sodowej **17**



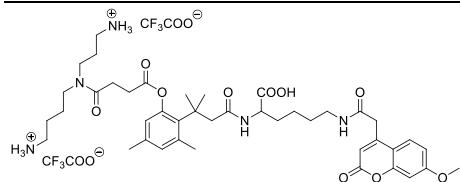
Pochodną **17** otrzymano analogicznie jak związek **14**. Wychodząc z 810 mg (1.1 mmol) soli kwasu chlowego **144**, 384 mg (1.1 mmol) TDBTU oraz 438 mg (maksymalnie 0.55 mmol) surowego produktu **139**, otrzymano 498 mg (0.25 mmol, ~45%) produktu **17** w postaci jasnoneżowego ciała

stałego o R_f 0.29 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 7/4/1, v/v/v).

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 6.82 (s, 1H), 6.65 (d, 1H), 4.66 (s, 2H), 4.45 (m, 2H), 4.25 (m, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.41 (m, 4H), 3.19 (m, 4H), 2.97-2.65 (m, 6H), 2.53 (m, 3H), 2.48-2.18 (m, 14H), 2.11 (m, 6H), 2.03-1.17 (m, 46H), 1.15-0.86 (m, 16H), 0.76 (s, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 176.35, 175.69, 175.55, 175.41, 173.28, 172.15, 171.98, 171.87, 150.00, 138.02, 136.18, 133.57, 131.93, 122.98, 116.89, 80.77, 79.37, 76.43, 52.09, 48.48, 46.12, 45.84, 45.25, 43.42, 42.23, 41.89, 39.47, 39.16, 38.54, 38.44, 36.47, 35.67, 35.40, 35.10, 34.10, 32.81, 32.62, 31.72, 31.28, 31.12, 30.29, 30.06, 29.01, 28.18, 27.58, 27.42, 27.30, 27.16, 27.00, 26.29, 25.64, 24.59, 24.46, 22.49, 21.78, 21.48, 18.93, 16.88, 11.58.

Koniugat trifluoroocetanu spermidyny z łącznikiem 'trimethyl lock' i Lys(Mca) **140**



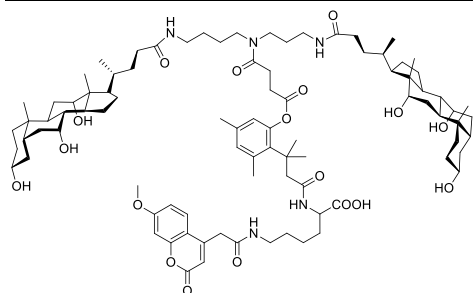
Związek **137** otrzymano analogicznie do **135**. Wychodząc z 409 mg (0.63 mmol) kwasu **133**, 220 μL DIPEA, 220 mg (0.63 mmol) TDBTU i 230 mg (0.63 mmol) Lys(Mca) **4**, otrzymano 600 mg (maksymalnie 0.6 mmol) produktu **137**

o R_f 0.33 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65/10/1, v/v/v).

Pochodną **140** otrzymano analogicznie jak związek **138**. Wychodząc z 600 mg (maksymalnie 0.6 mmol) związku **137** otrzymano 613 mg (maksymalnie 0.6 mmol)

surowego produktu **140** w postaci oleju, który poddano kolejnym przemianom bez dalszego oczyszczania.

Koniugat parasola cholowego z łącznikiem 'trimethyl lock' i Lys(Mca) **20**



Pochodną **20** otrzymano analogicznie jak związek **142**. Wychodząc z 295 mg (0.72 mmol) kwasu chłowego **6**, 252 mg (0.72 mmol) TDBTU oraz 365 mg (maksymalnie 0.36 mmol) surowego produktu **140**, otrzymano 210 mg (0.13 mmol, 36%) produktu **20** w postaci jasnoniebieskiego ciała stałego. Produkt oczyszczano na drodze

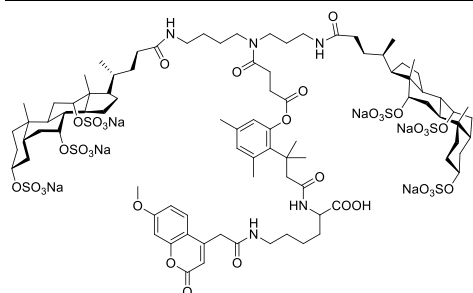
chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65/10/1, v/v/v a następnie $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 7/4/1, v/v/v.

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{90}\text{H}_{135}\text{N}_5\text{O}_{18}$ 1573.980; znalezione 1574.985 $[\text{M}+1]^+$.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.68 (d, 1H), 6.96 (d, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.79 (s, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.36 (m, 6H), 3.24-3.08 (m, 6H), 2.91 (m, 2H), 2.81 (m, 3H), 2.55 (s, 4H), 2.27 (m, 6H), 2.18-1.19 (m, 57H), 1.18-0.85 (m, 18H), 0.86 (s, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.37, 172.99, 171.95, 169.04, 163.16, 161.67, 155.34, 151.13, 150.04, 138.09, 136.01, 133.65, 131.91, 126.05, 122.81, 112.68, 100.47, 78.09, 72.51, 71.42, 67.55, 55.18, 54.73, 46.57, 46.02, 41.87, 41.46, 39.57, 39.16, 39.03, 38.83, 36.41, 35.56, 35.09, 34.51, 32.77, 31.92, 31.18, 30.00, 29.75, 29.31, 28.45, 28.21, 27.57, 27.39, 27.19, 26.47, 26.31, 22.57, 24.52, 22.83, 22.45, 21.85, 19.01, 16.37, 11.66.

Koniugat zestryfikowanego tritlenkiem siarki parasola cholowego z Lys(Mca) w postaci soli sodowej **21**



Pochodną **21** otrzymano analogicznie jak związek **15**. Wychodząc z 530 mg (0.72 mmol) soli kwasu chłowego **144**, 252 mg (0.72 mmol) TDBTU oraz 365 mg (maksymalnie 0.36 mmol) surowego produktu **140**, otrzymano 210 mg (0.10 mmol, 38%) produktu **21** w postaci jasnoniebieskiego ciała stałego. Produkt oczyszczano na drodze chromatografii

kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 7/4/1, v/v/v.

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 7.72 (d, 1H), 6.98 (d, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 4.66 (s, 2H), 4.44 (s, 2H), 4.13 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.77 (s, 2H), 3.40 (m, 4H), 3.19 (m, 6H), 2.90 (m, 2H), 2.82 (m, 3H), 2.56-1.18 (m, 67H), 1.18-0.87 (m, 18H), 0.74 (m, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 175.48, 173.21, 172.06, 169.00, 163.50, 163.19, 161.74, 155.17, 151.35, 149.91, 137.98, 136.08, 133.56, 131.87, 126.15, 122.85, 112.63, 112.39, 112.24,



100.56, 81.01, 79.86, 76.43, 55.10, 53.75, 48.39, 46.03, 45.16, 43.45, 42.37, 42.30, 41.94, 39.51, 39.23, 38.73, 38.36, 36.44, 34.57, 34.93, 34.08, 32.78, 31.64, 31.16, 30.33, 30.22, 30.09, 28.96, 28.53, 28.19, 27.61, 27.46, 27.31, 27.18, 26.27, 25.66, 24.64, 24.47, 22.47, 21.77, 18.95, 16.85, 11.53.

ROZDZIAŁ 

8. Summary

Nowadays, one of the most serious problems in modern medicine are systemic mycoses. Despite the rapid development of medicine allowing effective diagnosis and treatment of diseases caused by pathogenic microorganisms, there still exist an upward trend in mycosis. Thus, there is a constant need to create new drugs and develop existing medicines toward increased anti-fungal activity and simultaneous low cytotoxicity against human cells.

As a part of the research described in this dissertation, the conjugates of molecular umbrellas with fungal enzymes inhibitors, FMDP and *cis*-pentacin were designed, synthesised and characterised. The active molecules of FMDP and *cis*-pentacin exhibit very promising enzyme inhibitory properties, but in view of their chemical structure determining high hydrophilic properties also show highly reduced ability to cross the cell membrane. Molecular umbrellas are the relatively new class of nanocarriers able to penetrate the cell membrane and transport the cargo molecules by spontaneous diffusion. As a result of research work, fourteen conjugates were obtained – ten derivatives carrying biologically active cargo and four fluorescent conjugates. Moreover, the usage of three different linkers in the formation of conjugates was tested. Two alternative techniques of molecular umbrella formation were proposed. Conjugates, the simplest in their chemical structure are the direct connection between nanocarrier and cargo structures, attached by amide bonds. The rest of conjugates carry the specific linker mediated between nanocarrier and cargo structure. One of this linker is dipeptide structure in which the cargo molecule is connected to nanocarrier by a peptide bond. The other applied linker is 'trimethyl lock', that undergoes enzymatic cleavage proceeded by cell esterases. Finally, an attempt was made to synthesise conjugates carrying *o*-dithiocarbamate linker including disulphide bond in its structure and decomposes in cell media by glutathione molecules reductive activity.

All of the target conjugates were characterised in their chemical structure using spectroscopic techniques: ^1H NMR and ^{13}C NMR. The anti-fungal activity and hemotoxicity were evaluated.

ROZDZIAŁ 9

9. Literatura

1. Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 133–163 (2007).
2. White, T. C., Marr, K. A. & Bowden, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 382–402 (1998).
3. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P. & Schaefer-Korting, M. Mutschler farmakologia i toksykologia podręcznik. *MedPharm Polska*. ISBN: 978-83-7609-719-0 (2016).
4. Milewski, S. Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1597**, 173–192 (2002).
5. Teplyakov, A., Obmolova, G., Badet, B. & Badet-Denisot, M.-A. Channeling of ammonia in glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Mol. Biol.* **313**, 1093–1102 (2001).
6. Milewski, S., Kuszczak, D., Jedrzejczak, R., Smith, R. J., Brown, A. J., Gooday, G. W. Oligomeric structure and regulation of *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 4000–8 (1999).
7. Tarnowska, M., Oldziej, S., Liwo, A., Grzonka, Z. & Borowski, E. Investigation of the inhibition pathway of glucosamine synthase by N3-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid by semiempirical quantum mechanical and molecular mechanics methods. *Eur. Biophys. J.* **21**, 273–280 (1992).
8. Chmara, H., Milewski, S., Andruszkiewicz, R., Mignini, F. & Borowski, E. Antibacterial action of dipeptides containing an inhibitor of glucosamine-6-phosphate isomerase. *Microbiology* **144**, 1949–1358 (1998).
9. Zgódka, D., Jędrzejczak, R., Milewski, S. & Borowski, E. Amide and ester derivatives of N3-(4-methoxyfumaroyl)-(S)-2,3-diaminopropanoic acid: the selective inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthase. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 931–938 (2001).
10. Skwarecki, A. S., Milewski, S., Schielmann, M. & Milewska, M. J. Antimicrobial molecular nanocarrier–drug conjugates. *Nanomed. Nanotechnol.* **12**, 2215–2240 (2016).
11. Wong, B. S., Yoong, S. L., Jagusiak, A., Panczyk, T., Ho, H. K., Ang, W. H. & Pastorin, G. Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1964–2015 (2013).
12. Bando, S., Rao, A. M., Williams, K. A., Thess, A., Smalley, R. E. & Eklund, P. C. Purification of single-wall carbon nanotubes by microfiltration. *J. Phys. Chem. B.* **101**, 8839–8842 (1997).

13. Chen, R. J., Zhang, Y., Wang, D. & Hongjie, D. Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3838–3839 (2001).
14. Kam, N. W. S., Liu, Z. & Hongjie, D. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12492–12493 (2005).
15. Rosca, I. D., Watari, F., Uo, M. & Akasaka, T. Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. *Carbon N. Y.* **43**, 3124–3131 (2005).
16. Moghaddam, M. J., Taylor, S., Gao, M., Huang, S., Dai, L. & McCall, M. J. Highly efficient binding of DNA on the sidewalls and tips of carbon nanotubes using photochemistry. *Nano Lett.* **4**, 89–93 (2004).
17. Coleman, K. S., Bailey, S. R., Fogden, S. & Green, M. L. H. Functionalization of single-walled carbon nanotubes via the Bingel reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8722–8723 (2003).
18. Tagmatarchis, N. & Prato, M. Functionalization of carbon nanotubes via 1,3-dipolar cycloadditions. *J. Mater. Chem.* **14**, 437 (2004).
19. Bianco, A. & Prato, M. Can carbon nanotubes be considered useful tools for biological applications? *Adv. Mater.* **15**, 1765–1768 (2003).
20. Pantarotto, D., Partidos, C. D., Graff, R., Hoebeke, J., Briand, J.-P., Prato, M. & Bianco, A. Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6160–6164 (2003).
21. Pantarotto, D., Partidos, C. D., Hoebeke, J., Brown, F., Kramer, E., Briand, J.-P., Muller, S., Prato, M. & Bianco, A. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem. Biol.* **10**, 961–966 (2003).
22. Bianco, A., Kostarelos, K., Partidos, C. D., Prato, M., Hamers, R. J., Erie, D., Usrey, M. L., Dresselhaus, M. S., McLean, R. S., Onoa, G. B., Samsonidze, G. G., Semke, E. D., Usrey, M. & Walls, D. J. Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chem. Commun.* **2**, 571 (2005).
23. Kam, N. W. S., Jessop, T. C., Wender, P. A. & Hongjie, D. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube–protein conjugates into mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6850–6851 (2004).
24. Kam, N. W. S. & Hongjie, D. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 6021–6026 (2005).
25. Pantarotto, D., Singh, R., McCarthy, D., Erhardt, M., Briand, J.-P., Prato, M., Kostarelos, K. & Bianco, A. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew. Chemie Int. Ed.* **43**, 5242–5246 (2004).
26. Singh, R., Pantarotto, D., McCarthy, D., Chaloin, O., Hoebeke, J., Partidos, C. D., Briand, J.-P., Prato, M., Bianco, A. & Kostarelos, K. Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4388–4396 (2005).
27. Liu, Y., Wu, D.-C., Zhang, W.-D., Jiang, X., He, C.-B., Chung, T. S., Goh, S. H. & Leong, K. W. Polyethylenimine-grafted multiwalled carbon nanotubes for secure noncovalent immobilization and efficient delivery of DNA. *Angew. Chemie Int. Ed.* **44**, 4782–4785 (2005).
28. Gao, L., Nie, L., Wang, T., Qin, Y., Guo, Z., Yang, D. & Yan, X. Carbon nanotube delivery of the GFP gene into mammalian cells. *ChemBioChem* **7**, 239–242 (2006).
29. Crinelli, R., Carloni, E., Menotta, M., Giacomini, E., Bianchi, M., Ambrosi, G., Giorgi, L. & Magnani, M. Oxidized ultrashort nanotubes as carbon scaffolds for the



- construction of cell-penetrating NF- κ B decoy molecules. *ACS Nano* **4**, 2791–2803 (2010).
30. Zhang, X., Meng, L., Lu, Q., Fei, Z. & Dyson, P. J. Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes. *Biomaterials* **30**, 6041–6047 (2009).
 31. Heister, E., Neves, V., Tilmaciu, C., Lipert, K., Beltran, V. S., Coley, H. M., Silva, S. R. P. & McFadden, J. Triple functionalisation of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy. *Carbon N. Y.* **47**, 2152–2160 (2009).
 32. Chaudhuri, P., Soni, S. & Sengupta, S. Single-walled carbon nanotube-conjugated chemotherapy exhibits increased therapeutic index in melanoma. *Nanotechnology* **21**, 25102 (2010).
 33. Li, R., Wu, R., Zhao, L., Wu, M., Yang, L. & Zou, H. P-glycoprotein antibody functionalized carbon nanotube overcomes the multidrug resistance of human leukemia cells. *ACS Nano* **4**, 1399–1408 (2010).
 34. Liu, Z., Sun, X., Nakayama-Ratchford, N. & Dai, H. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. *ACS Nano* **1**, 50–56 (2007).
 35. Kumar, S., Hasumura, T., Nagaoka, Y., Yoshida, Y., Maekawa, T. & Jeymohan, P. Accelerated killing of cancer cells using a multifunctional single-walled carbon nanotube-based system for targeted drug delivery in combination with photothermal therapy. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 2653 (2013).
 36. Feazell, R. P., Nakayama-Ratchford, N., Dai, H. & Lippard, S. J. Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum(IV) anticancer drug design. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 8438–9 (2007).
 37. Zhang, Z., Yang, X., Zhang, Y., Zeng, B., Wang, S., Zhu, T., Roden, R. B. S., Chen, Y. & Yang, R. Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4933–4939 (2006).
 38. Yang, D., Yang, F., Hu, J., Long, J., Wang, C., Fu, D. & Ni, Q. Hydrophilic multi-walled carbon nanotubes decorated with magnetite nanoparticles as lymphatic targeted drug delivery vehicles. *Chem. Commun. (Camb.)* **7**, 4447–4449 (2009).
 39. Samori, C., Ali-Boucetta, C., Sainz, R., Guo, C., Toma, F. M., Fabbro, C., de Ros, T., Prato, M., Kostarelos, K. & Bianco, A. Enhanced anticancer activity of multi-walled carbon nanotube–methotrexate conjugates using cleavable linkers. *Chem. Commun.* **46**, 1494–1496 (2010).
 40. Chen, J., Chen, S., Zhao, X., Kuznetsova, L. V., Wong, S. S. & Ojima, I. Functionalized single-walled carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16778–85 (2008).
 41. Liu, Z., Chen, K., Davis, C., Sherlock, S., Cao, Q., Chen, X. & Dai, H. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Res.* **68**, 6652–6660 (2008).
 42. Sobhani, Z., Dinarvand, R., Atyabi, F., Ghahremani, M. & Adeli, M. Increased paclitaxel cytotoxicity against cancer cell lines using a novel functionalized carbon nanotube. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 705–19 (2011).
 43. Hampel, S., Kunze, D., Haase, D., Kramer, K., Rauschenbach, M., Ritschel, M., Leonhardt, A., Thomas, J., Oswald, S., Hoffmann, V. & Buchner, D. Carbon nanotubes filled with a chemotherapeutic agent: a nanocarrier mediates inhibition of tumor cell growth. *Nanomedicine* **3**, 175–182 (2008).
 44. Wu, W., Li, R., Bian, X., Zhu, Z., Ding, D., Li, X., Jia, Z., Jiang, X. & Hu, Y. Covalently combining carbon nanotubes with anticancer agent: preparation and antitumor



- activity. *ACS Nano* **3**, 2740–2750 (2009).
45. Wu, L., Ficker, M., Christensen, J. B., Trohopoulos, P. N. & Moghimi, S. M. Dendrimers in medicine: therapeutic concepts and pharmaceutical challenges. *Bioconjug. Chem.* **26**, 1198–1211 (2015).
 46. Lee, C. C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M. J. & Szoka, F. C. Designing dendrimers for biological applications. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1517–1526 (2005).
 47. Svenson, S. & Tomalia, D. A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 102–115 (2012).
 48. Tomalia, D. A. Starburst dendrimers - Nanoscopic supermolecules according to dendritic rules and principles. *Macromol. Symp.* **101**, 243–255 (1996).
 49. Hawker, C. J. & Frechet, J. M. J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7638–7647 (1990).
 50. Nanjwade, B. K., Bechra, H. M., Derkar, G. K., Manvi, F. V. & Nanjwade, V. K. Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* **38**, 185–196 (2009).
 51. Maraval, V., Pyzowski, J., Caminade, A.-M. & Majoral, J.-P. ‘Lego’ chemistry for the straightforward synthesis of dendrimers. *J. Org. Chem.* **68**, 6043–6046 (2003).
 52. Wu, P., Feldman, A. K., Nugent, A. K., Hawker, C. J., Scheel, A., Voit, B., Pyun, J., Frechet, J. M. J., Sharpless, K. B. & Fokin, V. V. Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper(I)-catalyzed ligation of azides and alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 3928–3932 (2004).
 53. Killops, K. L., Campos, L. M. & Hawker, C. J. Robust, efficient, and orthogonal synthesis of dendrimers via thiol-ene ‘click’ chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5062–5064 (2008).
 54. Denkewaler, R., Kolc, J. & Lukasavage, W. Macromolecular highly branched homogeneous compound based on lysine units. (1981).
 55. de Brabander-van den Berg, E. M. M. & Meijer, E. W. Poly(propylene imine) dendrimers: large-scale synthesis by heterogeneously catalyzed hydrogenations. *Angew. Chem. Int. Ed. English* **32**, 1308–1311 (1993).
 56. Wörner, C. & Mühlaupt, R. Polynitrile- and polyamine-functional poly(trimethylene imine) dendrimers. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **32**, 1306–1308 (1993).
 57. Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J. & Smith, P. A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polym. J.* **17**, 117–132 (1985).
 58. Wu, J., Zhou, J., Qu, F., Bao, P., Zhang, Y., Peng, L., Roeck, J., Ryder, J. & Smith, P. Polycationic dendrimers interact with RNA molecules: polyamine dendrimers inhibit the catalytic activity of *Candida* ribozymes. *Chem. Commun.* **30**, 313 (2005).
 59. Liu, X., Rocchi, P., Qu, F., Zheng, S., Liang, Z., Gleave, M., Iovanna, J. & Peng, L. PAMAM dendrimers mediate siRNA delivery to target Hsp27 and produce potent antiproliferative effects on prostate cancer cells. *ChemMedChem* **4**, 1302–1310 (2009).
 60. Liu, X., Wu, J., Yammine, M., Zhou, J., Posocco, P., Viel, S., Liu, C., Ziarelli, F., Fermeglia, M., Pricl, S., Victorero, G., Nguyen, C., Erbacher, P., Behr, J.-P. & Peng, L. Structurally flexible triethanolamine core PAMAM dendrimers are effective nanovectors for DNA transfection in vitro and in vivo to the mouse thymus. *Bioconjug. Chem.* **22**, 2461–2473 (2011).
 61. Liu, X., Liu, C., Laurini, E., Posacco, P., Qu, F., Rocchi, P. & Peng, L. Efficient delivery of sticky siRNA and potent gene silencing in a prostate cancer model using a generation 5 triethanolamine-core PAMAM dendrimer. *Mol. Pharm.* **9**, 470–481



- (2012).
62. Cardona, C. M. & Gawley, R. E. An improved synthesis of a trifurcated newkome-type monomer and orthogonally protected two-generation dendrons. *J. Org. Chem.* **67**, 1411–1413 (2002).
 63. Mignani, S., Kazzouli, S. El, Bousmina, M. & Majoral, J.-P. Dendrimer space concept for innovative nanomedicine: A futuristic vision for medicinal chemistry. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 993–1008 (2013).
 64. Mignani, S., El Kazzouli, S., Bousmina, M. M. & Majoral, J.-P. Dendrimer space exploration: an assessment of dendrimers/dendritic scaffolding as inhibitors of protein–protein interactions, a potential new area of pharmaceutical development. *Chem. Rev.* **114**, 1327–1342 (2014).
 65. Zhang, W., Jiang, J., Qin, C., Perez, L. M., Parrish, A. R., Safe, S. H. & Simanek, E. E. Triazine dendrimers for drug delivery: evaluation of solubilization properties, activity in cell culture, and in Vivo toxicity of a candidate vehicle. *Supramol. Chem.* **15**, 607–616 (2003).
 66. Crampton, H. L. & Simanek, E. E. Dendrimers as drug delivery vehicles: non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers. *Polym. Int.* **56**, 489–496 (2007).
 67. Lim, J. & Simanek, E. E. Triazine dendrimers as drug delivery systems: From synthesis to therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 826–835 (2012).
 68. Haag, R., Sunder, A. & Stumbé, J.-F. An approach to glycerol dendrimers and pseudo-dendritic polyglycerols. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2954–2955 (2000).
 69. Feliu, N., Walter, M. V., Montanez, M. I., Kunzmann, A., Hult, A., Nystrom, A., Malkoch, M. & Fadeel, B. Stability and biocompatibility of a library of polyester dendrimers in comparison to polyamidoamine dendrimers. *Biomaterials* **33**, 1970–1981 (2012).
 70. Sánchez-Nieves, J., Ortega, P., Muñoz-Fernández, M. Á., Gómez, R. & de la Mata, F. J. Synthesis of carbosilane dendrons and dendrimers derived from 1,3,5-trihydroxybenzene. *Tetrahedron* **66**, 9203–9213 (2010).
 71. Fuentes-Paniagua, E., Hernandez-Ros, J. M., Sanchez-Milla, M., Camero, M. A., Maly, M., Perez-Serrano, J., Copa-Patino, J. L., Sanchez-Nieves, J., Solireri, J., Gomez, R., Javier de la mata, F. & Bryszewska, M. Carbosilane cationic dendrimers synthesized by thiol–ene click chemistry and their use as antibacterial agents. *RSC Adv.* **4**, 1256–1265 (2014).
 72. Türp, D., Nguyen, T.-T.-T. & Mullen, K. Uniquely versatile: nano-site defined materials based on polyphenylene dendrimers. *New J. Chem.* **36**, 282–298 (2012).
 73. Jain, N. K. & Gupta, U. Application of dendrimer–drug complexation in the enhancement of drug solubility and bioavailability. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 1035–1052 (2008).
 74. Demanuele, A. & Attwood, D. Dendrimer–drug interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2147–2162 (2005).
 75. Albertazzi, L., Storti, B., Marchetti, L. & Beltram, F. Delivery and subcellular targeting of dendrimer-based fluorescent pH sensors in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 18158–18167 (2010).
 76. Nguyen, T. H., Bryant, H., Shapsa, A., Street, H., Mani, V., Fayad, Z. A., Frank, J. A., Tsimikas, S. & Briley-Saebo, K. C. Manganese G8 dendrimers targeted to oxidation-specific epitopes: In vivo MR imaging of atherosclerosis. *J. Magn. Reson. Imaging* **41**, 797–805 (2015).
 77. Taratula, O., Schumann, C., Naleway, M. A., Pang, A. J., Chon, K. J. & Taratula, O. A multifunctional theranostic platform based on phthalocyanine-loaded dendrimer



- for image-guided drug delivery and photodynamic therapy. *Mol. Pharm.* **10**, 3946–3958 (2013).
78. Liu, C., Liu, X., Rocchi, P., Qu, F., Iovanna, J. L. & Peng, L. Arginine-terminated generation 4 PAMAM dendrimer as an effective nanovector for functional siRNA delivery in vitro and in vivo. *Bioconjug. Chem.* **25**, 521–532 (2014).
 79. Durán-Lara, E., Guzman, L., John, A., Fuentes, E., Alarcon, M., Palomo, I. & Santos, L. S. PAMAM dendrimer derivatives as a potential drug for antithrombotic therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **69**, 601–608 (2013).
 80. Liu, J., Gray, W. D., Davis, M. E. & Luo, Y. Peptide- and saccharide-conjugated dendrimers for targeted drug delivery: a concise review. *Interface Focus* **2**, 307–324 (2012).
 81. Kaminskas, L. M., Kelly, B. D., McLeod, V. M., Sberna, G., Owen, D. J., Boyd, B. J. & Porter, C. J. H. Characterisation and tumour targeting of PEGylated polylysine dendrimers bearing doxorubicin via a pH labile linker. *J. Control. Release* **152**, 241–248 (2011).
 82. Liu, J., Zhou, J. & Luo, Y. siRNA delivery systems based on neutral cross-linked dendrimers. *Bioconjug. Chem.* **23**, 174–183 (2012).
 83. Seo, J. W., Baek, H., Mahakian, L. M., Kusunose, J., Hamzah, J., Ruoslahti, E. & Ferrara, K. W. 64Cu-labeled LyP-1-dendrimer for PET-CT imaging of atherosclerotic plaque. *Bioconjug. Chem.* **25**, 231–239 (2014).
 84. Sharma, R., Kottari, N., Chabre, Y. M., Abbassi, L., Shiao, T. C. & Roy, R. A highly versatile convergent/divergent ‘onion peel’ synthetic strategy toward potent multivalent glycodendrimers. *Chem. Commun.* **50**, 13300–13303 (2014).
 85. Sharma, R., Naresh, K., Chabre, Y. M., Rej, R., Saadeh, N. K. & Roy, R. ‘Onion peel’ dendrimers: a straightforward synthetic approach towards highly diversified architectures. *Polym. Chem.* **5**, 4321 (2014).
 86. Kottari, N., Kottari, N., Chabre, Y. M., Shiao, T. C., Rej, R. & Roy, R. Efficient and accelerated growth of multifunctional dendrimers using orthogonal thiol–ene and SN2 reactions. *Chem. Commun.* **50**, 1983 (2014).
 87. Lowe, A. B. Thiol-ene ‘click’ reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polym. Chem.* **1**, 17–36 (2010).
 88. Chauhan, A. S., Svideri, S., Chalasani, K. B., Jain, A. K., Jain, S. K., Jain, N. K. & Diwan, P. V. Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *J. Control. Release* **90**, 335–343 (2003).
 89. Gupta, U., Agashe, H. B. & Jain, N. K. Polypropylene imine dendrimer mediated solubility enhancement: effect of pH and functional groups of hydrophobes. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **10**, 358–367 (2007).
 90. Kolhe, P., Khandare, J., Pillai, O., Kannan, S., Lieh-Lai, M. & Kannan, R. M. Preparation, cellular transport, and activity of polyamidoamine-based dendritic nanodevices with a high drug payload. *Biomaterials* **27**, 660–669 (2006).
 91. Milhem, O. M., Myles, C., McKeown, N. B., Attwood, D. & D’Emanuele, A. Polyamidoamine Starburst® dendrimers as solubility enhancers. *Int. J. Pharm.* **197**, 239–241 (2000).
 92. Kolhe, P. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *Int. J. Pharm.* **259**, 143–160 (2003).
 93. Namazi, H. & Adeli, M. Dendrimers of citric acid and poly (ethylene glycol) as the new drug-delivery agents. *Biomaterials* **26**, 1175–1183 (2005).
 94. Yiyun, C. & Tongwen, X. Dendrimers as Potential Drug Carriers. Part I. Solubilization of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Presence of Polyamidoamine Dendrimers. *Eur. J. Med. Chem.* **40**, 1188–1192 (2005).



95. Asthana, A., Chauhan, A. S., Diwan, P. V. & Jain, N. K. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendritic nanostructures for controlled sitespecific delivery of acidic anti-inflammatory active ingredient. *AAPS PharmSciTech* **6**, E536–E542 (2005).
96. Wiwattanapatapee, R., Lomlim, L. & Saramunee, K. Dendrimers conjugates for colonic delivery of 5-aminosalicylic acid. *J. Control. Release* **88**, 1–9 (2003).
97. Bhadra, D., Bhadra, S. & Jain, N. K. Pegylated lysine based copolymeric dendritic micelles for solubilization and delivery of artemether. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **8**, 467–82 (2005).
98. Agrawal, P., Gupta, U. & Jain, N. K. Glycoconjugated peptide dendrimers-based nanoparticulate system for the delivery of chloroquine phosphate. *Biomaterials* **28**, 3349–3359 (2007).
99. Bhadra, D., Yadav, A. K., Bhadra, S. & Jain, N. K. Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting. *Int. J. Pharm.* **295**, 221–233 (2005).
100. Bhadra, D., Bhadra, S. & Jain, N. K. PEGylated peptide dendrimeric carriers for the delivery of antimalarial drug chloroquine phosphate. *Pharm. Res.* **23**, 623–633 (2006).
101. Kumar, V. P., Agashe, H., Dutta, T. & Jain, N. PEGylated dendritic architecture for development of a prolonged drug delivery system for an antitubercular drug. *Curr. Drug Deliv.* **4**, 11–19 (2007).
102. Kumar, P. V., Asthana, A., Dutta, T. & Jain, N. K. Intracellular macrophage uptake of rifampicin loaded mannosylated dendrimers. *J. Drug Target.* **14**, 546–556 (2006).
103. Beezer, A. E., King, A. S. H., Martin, I. K., Mitchel, J. C., Twyman, L. J. & Wain, C. F. Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives. *Tetrahedron* **59**, 3873–3880 (2003).
104. Cheng, Y., Qu, H., Ma, M., Xu, Z., Xu, P., Fang, Y. & Xu, T. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as biocompatible carriers of quinolone antimicrobials: An in vitro study. *Eur. J. Med. Chem.* **42**, 1032–1038 (2007).
105. Ma, M., Cheng, Y., Xu, Z., Xu, P., Qu, H., Fang, Y., Xu, T. & Wen, L. Evaluation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as drug carriers of anti-bacterial drugs using sulfamethoxazole (SMZ) as a model drug. *Eur. J. Med. Chem.* **42**, 93–98 (2007).
106. Yang, H. & Lopina, S. T. Penicillin V-conjugated PEG-PAMAM star polymers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **14**, 1043–1056 (2003).
107. Sideratou, Z., Tsiourvas, D. & Paleos, C. M. Solubilization and release properties of PEGylated diaminobutane poly(propylene imine) dendrimers. *J. Colloid Interface Sci.* **242**, 272–276 (2001).
108. Khandare, J., Kolhe, P., Pillai, O., Kannan, S., Lieh-Lai, M. & Kannan, R. M. Synthesis, cellular transport, and activity of polyamidoamine dendrimer-methylprednisolone conjugates. *Bioconjug. Chem.* **16**, 330–337 (2005).
109. Dutta, T. & Jain, N. K. Targeting potential and anti-HIV activity of lamivudine loaded mannosylated poly(propyleneimine) dendrimer. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1770**, 681–686 (2007).
110. Dutta, T., Garg, M. & Jain, N. K. Targeting of efavirenz loaded tuftsin conjugated poly(propyleneimine) dendrimers to HIV infected macrophages in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.* **34**, 181–189 (2008).
111. Yang, H. & Lopina, S. T. Extended release of a novel antidepressant, venlafaxine, based on anionic polyamidoamine dendrimers and poly(ethylene glycol)-containing semi-interpenetrating networks. *J. Biomed. Mater. Res.* **72A**, 107–114 (2005).
112. Padilla De Jesús, O. L., Ihre, H. R., Gagne, L., Fréchet, J. M. J. & Szoka Jr, F. C. Polyester dendritic systems for drug delivery applications: in vitro and in vivo



- evaluation. *Bioconjug. Chem.* **13**, 453–461 (2002).
113. Lee, C. C., Gillies, E. R., Fox, M. E., Guillaudeu, S. J., Frechet, J. M. J., Dy, E. E. & Szoka, F. C. A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16649–54 (2006).
 114. Zhu, S., Hong, M., Zhang, L., Tang, L., Jiang, Y. & Pei, Y. PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugates: in vitro evaluation and in vivo tumor accumulation. *Pharm. Res.* **27**, 161–174 (2010).
 115. Fu, F., Wu, Y., Zhu, J., Wen, S., Shen, M. & Shi, X. Multifunctional lactobionic acid-modified dendrimers for targeted drug delivery to liver cancer cells: investigating the role played by PEG spacer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 16416–16425 (2014).
 116. Gurdag, S., Khandare, J., Stapels, S., Matherly, L. H. & Kannan, R. M. Activity of dendrimer–methotrexate conjugates on methotrexate-sensitive and -resistant cell lines. *Bioconjug. Chem.* **17**, 275–283 (2006).
 117. Thomas, T. P., Majoros, I. J., Kotlyar, A., Kukowska-Latallo, J. F., Bielinska, A., Myc, A. & Bakar Jr, J. R. Targeting and inhibition of cell growth by an engineered dendritic nanodevice. *J. Med. Chem.* **48**, 3729–3735 (2005).
 118. Neerman, M. F., Chen, H.-T., Parrish, A. R. & Simanek, E. E. Reduction of drug toxicity using dendrimers based on melamine. *Mol. Pharm.* **1**, 390–393 (2004).
 119. Lim, J., Chouai, A., Lo, S.-T., Liu, W., Sun, X. & Simanek, E. E. Design, synthesis, characterization, and biological evaluation of triazine dendrimers bearing paclitaxel using ester and ester/disulfide linkages. *Bioconjug. Chem.* **20**, 2154–2161 (2009).
 120. Wandersman, C. & Delepelaire, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 611–647 (2004).
 121. Miethke, M. & Marahiel, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 413–51 (2007).
 122. Hider, R. C. & Kong, X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 637 (2010).
 123. Roosenberg II, J., Lin, Y.-M., Lu, Y. & Miller, M. Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents. *Curr. Med. Chem.* **7**, 159–197 (2000).
 124. Wittman, M. D., Halcomb, R. L. & Danishefsky, S. J. On the conversion of biologically interesting amines to hydroxylamines. *J. Org. Chem.* **55**, 1981–1983 (1990).
 125. Hu, J. & Miller, M. J. A new method for the synthesis of N.ε-acetyl-N.ε-hydroxy-L-lysine, the iron-binding constituent of several important siderophores. *J. Org. Chem.* **59**, 4858–4861 (1994).
 126. Bergeron, R. J. & Phanstiel, O. The total synthesis of nannochelin: a novel cinnamoyl hydroxamate-containing siderophore. *J. Org. Chem.* **57**, 7140–7143 (1992).
 127. Okujo, N., Sakakibara, Y., Yoshida, T. & Yamamoto, S. Structure of acinetoferrin, a new citrate-based dihydroxamate siderophore from *Acinetobacter haemolyticus*. *Biometals* **7**, 170–176 (1994).
 128. Buckley, G. M., Pattenden, G. & Whiting, D. A. New synthetic probes of the iron transport system of *Paracoccus denitrificans*. *Tetrahedron* **50**, 11781–11792 (1994).
 129. Shanzer, A., Libman, J., Lifson, S. & Felder, C. E. Origin of the iron(III) binding and conformational properties of enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7609–7619 (1986).
 130. Marinez, E. R., Salmassian, E. K., Lau, T. T. & Gutierrez, C. G. Enterobactin and enantioenterobactin. *J. Org. Chem.* **61**, 3548–3550 (1996).
 131. Meyer, M., Telford, J. R., Cohen, S. M., White, D. J., Xu, J. & Raymond, K. N. High-yield synthesis of the enterobactin trilactone and evaluation of derivative



- siderophore analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 10093–10103 (1997).
132. Ohkanda, J. & Katoh, A. N-hydroxyamide-containing heterocycles. part 4. synthesis and FeIII-chelating properties of novel hexadentate ligands composed of N-hydroxy-2(1H)-pyrazinone, amino acid residues, and Tris(2-aminoethyl)amine. *J. Org. Chem.* **60**, 1583–1589 (1995).
133. Ramurthy, S. & Miller, M. J. Framework-reactive siderophore analogs as potential cell-selective drugs. design and syntheses of trimelamol-based iron chelators. *J. Org. Chem.* **61**, 4120–4124 (1996).
134. Yanping, X. & Miller, M. J. Total syntheses of mycobactin analogues as potent antimycobacterial agents using a minimal protecting group strategy. *J. Org. Chem.* **63**, 4314–4322 (1998).
135. Watanabe, N. A., Nagasu, T., Katsu, K. & Kitoh, K. E-0702, a new cephalosporin, is incorporated into *Escherichia coli* cells via the tonB-dependent iron transport system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 497–504 (1987).
136. Kim, M. Y., Oh, J. I., Paek, K. S., Kim, Y. Z., Kim, I. C. & Kwak, J. H. In vitro and in vivo activities of LB10522, a new catecholic cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1825–31 (1996).
137. Maejima, T., Inoue, M. & Mitsushashi, S. In vitro antibacterial activity of KP-736, a new cephem antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 104–10 (1991).
138. Ohi, N., Aoki, B., Shinozaki, T., Moro, K., Noto, T., Nehasi, T., Okazaki, H. & Hatsunaga, T. Semisynthetic beta-lactam antibiotics. II Effect on antibacterial activity of ureido N-substituents in the 6-[(R)-2-[3-(3,4-dihydroxybenzoyl)-1-ureido]-2-phenylacetamido]penicillanic acid. *J. Antibiot.* **39**, 230–241 (1986).
139. Zahner, H., Diddens, H., Keller-Schierlein, W. & Nageli, H. U. Some experiments with semisynthetic sideromycins. *Jpn. J. Antibiot.* **30**, S201–S206 (1977).
140. Ji, C. & Miller, M. J. Chemical syntheses and in vitro antibacterial activity of two desferrioxamine B-ciprofloxacin conjugates with potential esterase and phosphatase triggered drug release linkers. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 3828–3836 (2012).
141. Ji, C. & Miller, M. J. Siderophore–fluoroquinolone conjugates containing potential reduction-triggered linkers for drug release: synthesis and antibacterial activity. *BioMetals* **28**, 541–551 (2015).
142. Reissmann, S. Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J. Pept. Sci.* **20**, 760–784 (2014).
143. Vives, E., Brodin, P. & Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 16010–16017 (1997).
144. Derossit, D., Joliott, M. H., Chassaingl, G. & Prochiantztn, M. The third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10444–10450 (1994).
145. Wang, F., Wang, Y., Zhang, X., Zhang, W., Guo, S. & Jin, F. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J. Control. Release* **174**, 126–136 (2014).
146. Ruczynski, J., Wierzbicki, P. M., Kogut-Wierzbicka, M., Mucha, P., Siedlicka-Kroplewska, K. & Rekowski, P. Cell-penetrating peptides as a promising tool for delivery of various molecules into the cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* **52**, 257–269 (2015).
147. Kawczyński, M. T., Kreczko-Kurzawa, J. & Maćkiewicz, Z. Peptydy penetrujące : rodzaje i mechanizmy przenikania przez błony komórkowe. *Wiadomości Chem.* **69**, 9–33 (2015).



148. Rothbard, J. B., Jessop, T. C., Lewis, R. S., Murray, B. A. & Wender, P. A. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9506–9507 (2004).
149. Fernández-Carneado, J., Kogan, M. J., Castel, S. & Giralt, E. Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of γ -zein. *Angew. Chemie Int. Ed.* **43**, 1811–1814 (2004).
150. Milletti, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* **17**, 850–860 (2012).
151. Lin, Y. Z., Yao, S. Y., Veach, R. A., Torgerson, T. R. & Hawiger, J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.* **270**, 14255–14258 (1995).
152. Hällbrink, M., Floren, A., Elmquist, A., Pooga, M., Batfai, T. & Langel, U. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1515**, 101–109 (2001).
153. Vocero-Akbani, A. M., Heyden, N. V, Lissy, N. A., Ratner, L. & Dowdy, S. F. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat. Med.* **5**, 29–33 (1999).
154. Wadia, J. & Dowdy, S. Modulation of cellular function by TAT mediated transduction of full length proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **4**, 97–104 (2003).
155. Drin, G., Déméné, H., Tamsamani, J. & Brasseur, R. Translocation of the pAntp peptide and its amphipathic analogue AP-2AL. *Biochemistry* **40**, 1824–1834 (2001).
156. Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A. R. & Tamsamani, J. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.* **278**, 31192–201 (2003).
157. Pooga, M., Soomets, U., Hallbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J.-X., Xu, X.-J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hokfelt, T. & Langel, U. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat. Biotechnol.* **16**, 857–861 (1998).
158. Astriab-Fisher, A., Sergueev, D., Fisher, M., Shaw, B. R. & Juliano, R. L. Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm. Res.* **19**, 744–754 (2002).
159. Sparr, C., Purkayastha, N., Kolesińska, B., Gengenbacher, M., Amulic, B., Matuschewski, K., Seebach, D. & Kamena, F. Improved efficacy of fosmidomycin against Plasmodium and Mycobacterium species by combination with the cell-penetrating peptide octaarginine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4689–98 (2013).
160. Purkayastha, N., Capone, S., Beck, A. K., Seebach, D., Leeds, J., Thompson, K. & Moser, H. E. Antibacterial activity of enrofloxacin and ciprofloxacin derivatives of β -octaarginine. *Chem. Biodivers.* **12**, 179–193 (2015).
161. Janout, V., Lanier, M. & Regen, S. L. Molecular Umbrellas. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1573–1574 (1996).
162. Janout, V. & Regen, S. L. Bioconjugate-based molecular umbrellas. *Bioconjug. Chem.* **20**, 183–192 (2009).
163. Ge, D., Wu, D., Wang, Z., Shi, W., Wu, T., Zhang, A., Hong, S., Wang, J., Zhang, Y. & Ren, L. Cellular uptake mechanism of molecular umbrella. *Bioconjug. Chem.* **20**, 2311–2316 (2009).
164. Mehiri, M., Chen, W.-H., Janout, V. & Regen, S. L. Molecular umbrella transport: exceptions to the classic size/lipophilicity rule. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 1338–1339



- (2009).
165. Janout, V., Di Giorgio, C. & Regen, S. L. Molecular umbrella-assisted transport of a hydrophilic peptide across a phospholipid membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2671–2672 (2000).
 166. Janout, V., Zhang, L., Staina, I. V., Di Giorgio, C. & Regen, S. L. Molecular umbrella-assisted transport of glutathione across a phospholipid membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5401–5406 (2001).
 167. Janout, V., Jing, B. & Regen, S. L. Molecular umbrella-assisted transport of thiolated AMP and ATP across phospholipid bilayers. *Bioconjug. Chem.* **13**, 351–356 (2002).
 168. Janout, V. & Regen, S. L. A needle-and-thread approach to bilayer transport: permeation of a molecular umbrella–oligonucleotide conjugate across a phospholipid membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 22–23 (2004).
 169. Janout, V., Cline, L. L., Feuston, B. P., Klein, L., O'Brien, A., Tucker, T., Yuan, Y., O'Neill-Davis, L. A., Peiffer, R. L., Nerurkar, S. S., Jadhav, V., Tellers, D. M. & Regen, S. L. Molecular umbrella conjugate for the ocular delivery of siRNA. *Bioconjug. Chem.* **25**, 197–201 (2014).
 170. Janout, V., Bienvenu, C., Schell, W., Perfect, J. R. & Regen, S. L. Molecular umbrella–amphotericin B conjugates. *Bioconjug. Chem.* **25**, 1408–1411 (2014).
 171. Jing, B., Janout, V. & Regen, S. L. Fully detachable molecular umbrellas as peptide delivery agents. *Bioconjug. Chem.* **14**, 1191–1196 (2003).
 172. Janout, V., Schell, W. A., Thevenin, D., Yu, Y., Perfect, F. R. & Regen, S. L. Taming amphotericin B. *Bioconjug. Chem.* **26**, 2021–2024 (2015).
 173. Cline, L. L., Janout, V., Fisher, M., Juliano, R. L. & Regen, S. L. A molecular umbrella approach to the intracellular delivery of small interfering RNA. *Bioconjug. Chem.* **22**, 2210–2216 (2011).
 174. Janout, V., Lanier, M. & Regen, S. L. Design and synthesis of molecular umbrellas. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 640–647 (1997).
 175. Okahata, Y., Ando, R. & Kunitake, T. Catalytic hydrolysis of p -nitrophenyl esters in the presence of representative ammonium aggregates. Specific activation of a cholesteryl nucleophile bound to a dialkylammonium bilayer membrane. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **52**, 3647–3653 (1979).
 176. Senter, P. D., Pearce, W. E. & Greenfield, R. S. Development of a drug-release strategy based on the reductive fragmentation of benzyl carbamate disulfides. *J. Org. Chem.* **55**, 2975–2978 (1990).
 177. Levine, M. N. & Raines, R. T. Trimethyl lock: a trigger for molecular release in chemistry, biology, and pharmacology. *Chem. Sci.* **3**, 2412 (2012).
 178. Thanassi, J. W. & Cohen, L. A. The conservation of oxidative energy in phosphate-free systems. Formation of acyl anhydrides via the oxidation of hydroquinone monocarboxylic esters. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **172**, 389–398 (1969).
 179. Ji, C., Miller, P. A. & Miller, M. J. Syntheses and antibacterial activity of N -acylated ciprofloxacin derivatives based on the trimethyl lock. *ACS Med. Chem. Lett.* **6**, 707–710 (2015).
 180. Nicolaou, M. G., Yuan, C.-S. & Borchardt, R. T. Phosphate prodrugs for amines utilizing a fast intramolecular hydroxy amide lactonization. *J. Org. Chem.* **61**, 8636–8641 (1996).
 181. Amsberry, K. L. & Borchardt, R. T. The lactonization of 2'-hydroxyhydrocinnamic acid amides: a potential prodrug for amines. *J. Org. Chem.* **55**, 5867–5877 (1990).
 182. Carpino, L. A., Triolo, S. A. & Berglund, R. A. Reductive lactonization of strategically methylated quinone propionic acid esters and amides. *J. Org. Chem.* **54**, 3303–3310 (1989).

183. Ilies, M. A., Seitz, W. A., Johnson, B. H., Ezell, E. L., Miller, A. L., Thompson, E. B. & Balaban, A. T. Lipophilic pyrylium salts in the synthesis of efficient pyridinium-based cationic lipids, gemini surfactants, and lipophilic oligomers for gene delivery. *J. Med. Chem.* **49**, 3872–3887 (2006).
184. Wagner, R. B. & Moore, J. A. The rearrangement of α,α' -dibromoketones. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 974–977 (1950).
185. Nishimura, T., Yamada, K., Takebe, T., Yokoshima, S. & Fukuyama, T. (1-Nosyl-5-nitroindol-3-yl)methyl ester: a novel protective group for carboxylic acids. *Org. Lett.* **10**, 2601–2604 (2008).
186. Chadwick, J., Jones, M., Mercer, A. E., Stocks, P. A., Ward, S. A., Park, B. K. & O'Neill, P. M. Design, synthesis and antimalarial/anticancer evaluation of spermidine linked artemisinin conjugates designed to exploit polyamine transporters in *Plasmodium falciparum* and HL-60 cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 2586–2597 (2010).

ROZDZIAŁ 10

10. Dorobek naukowy

Publikacje w czasopismach z listy JCR

Skwarecki, A. S., Milewski, S., Schielmann, M. & Milewska, M. J. Antimicrobial molecular nanocarrier–drug conjugates. *Nanomed. Nanotechnol.* **12**, 2215–2240 (2016).

Publikacje w przygotowaniu

Skwarecki A. S., Skarbek, K., Martynow D., Serocki M., Milewska M. J. & Milewski S. Molecular umbrellas modulate the selective toxicity of polyene macrolide antifungals. W przygotowaniu do druku.

Konferencje naukowe

Prezentacje ustne:

Skwarecki, A. S. Synthesis of disubstituted 1,3,4,9-tetrahydropyrano-[3,4-b]indole-1-acetic acids derivatives. *BioTech 2013* (2013).

Artykuły konferencyjne:

Skwarecki, A. S. Synthesis of disubstituted 1,3,4,9-tetrahydropyrano-[3,4-b]indole-1-acetic acids derivatives. *PhD Interdisciplinary Journal* **1**, 75-78 (2013).

Sesje posterowe:

Skwarecki, A. S., Milewska, M. J. Parasole Molekularne – potencjalne transportery substancji aktywnych do komórek grzybowych. *58 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Gdańsku*. Gdańsk (2015).

Skwarecki, A. S., Milewska, M. J., Milewski, S., Wiśniewska, A., Schielmann, M., Kawczyński, M. T. Synteza dipeptydów o aktywności przeciwgrzybowej zawierających inhibitor dehydrogenazy homoserynowej. *58 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Gdańsku*. Gdańsk (2015).

Skwarecki, A. S., Skarbek, K., Koperkiewicz, D., Milewska, M. J. Koniugaty parasoli molekularnych z makrolidami polienowymi. *59 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Poznaniu*. Poznań (2016).

