



Imię i nazwisko autora rozprawy: Kornelia Skarbek Dyscyplina naukowa: chemia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Modyfikacje chemiczne Amfoterycyny B i Nystatyny A₁.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Chemical modification of Amphotericin B and Nystatin A_1 .

Promotor

podpis

prof. dr hab. inż. Maria J. Milewska

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania mojej promotor Pani prof. dr hab. inż. Marii Milewskiej za opiekę naukową, wyrozumiałość, cierpliwość oraz za wszelką pomoc okazaną mi w realizacji tej pracy.

Dziękuję Panu dr inż. Pawłowi Sowińskiemu za nieocenioną pomoc w graficznym przedstawieniu oraz interpretacji dwuwymiarowych widm NMR.

Dziękuję Panu dr hab. Sławomirowi Makowcowi za cierpliwość oraz coroczną ocenę sprawozdań doktorskich.

Dziękuję Pani dr hab. Magdalenie Śliwce-Kaszyńskiej i dr Katarzynie Kozłowskiej-Tylingo za przeprowadzenie analiz HPLC oraz dr Pawłowi Kubicy za wykonanie analiz MS.

Pragnę również serdecznie podziękować wszystkim Pracownikom, Kolegom i Koleżankom z Katedry Chemii Organicznej, którzy swoją pomocą, wsparciem, życzliwością i dobrym słowem przyczynili się do powstania tej pracy.

Pragnę przede wszystkim podziękować mojej Mamie, za cierpliwość i wytrwałość oraz wiarę w moje możliwości nawet wtedy, kiedy sama w siebie wątpiłam. Bez niej nie osiągnęłabym tego wszystkiego.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów11
Streszczenie
Część literaturowa 15
1.Wstęp
2. Makrolidy polienowe
2.1. Struktura chemiczna makrolidów polienowych
2.1.1. Struktura chemiczna amfoterycyny B20
2.1.2. Struktura chemiczna nystatyn
2.2. Mechanizm działania przeciwgrzybowego makrolidów polienowych 22
2.3. Oporność mikroorganizmów na leki polienowe
3. Chemiczne modyfikacje makrolidów polienowych
3.1. Modyfikacje makrolidów polienowych na grupie aminowej jednostki
2 1 1 N agylowa pochodno mekrolidów policnowych 26
3.1.2. <i>N</i> alkilowa pochodna makrolidów policnowych
2.1.2. <i>N</i> -althowe pochodne matrolidów policiowych
2.2 Madufilacia maluralidásu nalianasural na crunia karkakuslassai
3.2. Modylikacje makrolidow polienowych na grupie karboksylowej
3.2.1. Estry makrolidow polienowych
3.2.2. Amidy, hydrazydy oraz pochodne mocznikowe makrolidów polienowych
3.3. Modyfikacje aglikonu makrolidów polienowych
3.3.1. Modyfikacje struktury makrolidów polienowych na atomach węgla C13 oraz C1435
3.3.2. Modyfikacje syntetyczne na atomie węgla C16 amfoterycyny B - redukcja grupy karboksylowej
3.3.3. Modyfikacje syntetyczne na atomie węgla C19 amfoterycyny B40
3.3.4. Modyfikacje na atomie węgla C'2 makrolidów polienowych42
3.4. Inne pochodne makrolidów polienowych
4. Synteza de novo półsyntetycznych analogów amfoterycyny B 49
Cel i zakres pracy
Wyniki i dyskusja
1. Synteza aglikonów makrolidów polienowych 54

2. Próby otrzymywania półsyntetycznych analogów amfoterycyny B 60
2.1. Badania reakcji substytucji nukleofilowej z udziałem aglikonu AmB 60
2.2. Badanie reakcji dehydracyjnej glikozylacji
2.2.1. Synteza hemisyntetycznych amfoterycyn
2.3. Interpretacja widm korelacyjnych otrzymanych koniugatów AmB 66
3. Synteza pochodnych aminocukrowych
3.1. Przegląd literaturowy syntez pochodnych aminocukrów
3.1.1. Synteza aminocukrów z wykorzystaniem reakcji substytucji nukleofilowej (S _N 2)70
3.1.2. Synteza aminocukrów z wykorzystaniem pochodnych epoksydowych72
3.1.3. Addycja grup zawierających atom azotu do wiązania podwójnego glukali
3.1.3.1. Addycja jonu azydkowego do glukali
3.1.3.2. Fotoindukowane tworzenie pierścienia azyrydynowego w glukalach
3.1.3.3. Asymetryczna aminohydroksylacja glukali
3.1.4. Addycja jonu cyjankowego do grupy karbonylowej cukru
3.1.5. Synteza totalna aminocukrów
3.1.5.1. Synteza <i>de novo</i> aminocukrów z alkoholi
3.1.5.2. Synteza <i>de novo</i> aminocukrów z wykorzystaniem kwasów, estrów lub laktonów jako substratów
3.2. Synteza pochodnych cukrowych
3.2.1. Synteza 3-azydo-3-deoksycukrów
3.2.1.1. Synteza 3-azydo-2,3,5-trideoksyksylozy
3.2.1.2. Synteza 3-azydo-3-deoksyheksoz
3.2.2. Synteza pochodnych glukozy
3.2.3. Synteza i właściwości 2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukozaminy oraz analogów 6-sulfo-D-glukitoli
4. Synteza koniugatów makrolidów polienowych z nanonośnikami
4.1. Wyniki badań biologicznych
5. Podsumowanie i wnioski końcowe
Część eksperymentalna 102
1. Aparatura

2. Synteza chronionych aglikonów makrolidów polienowych103
2.1. N-(9-Fluorenylmetoksykarbonylo)-makrolid polienowy – procedura ogólna 103
N-(9-Fluorenylmetoksykarbonylo)-nystatyna A ₁ (1)103
N-(9-Fluorenylmetoksykarbonylo)-amfoterycyna B (4)104
2.2. Ketal metylowy makrolidu polienowego – procedura ogólna 104
Ketal metylowy nystatyny A ₁ (2)105
Ketal metylowy amfoterycyny B (5)105
2.3. Eter nonatrietylosililowy makrolidu polienowego – procedura ogólna 105
Eter nonatrietylosililowy nystatyny A ₁ (3)106
Eter nonatrietylosililowy amfoterycyny B (6a)106
2.4. Ester allilowy N-Fmoc-nona-O-trietylosilylo-O-metylo-amfoterycyny B (7)107
2.5. Chroniony heptaenon (8)
2.6. Chroniony aglikon amfoterycyny B (9)109
3. Synteza niecukrowych pochodnych109
3.1. N-tert-butoksykarbonylo-4-fluoroanilina (13) 109
3.2. 3-[(<i>N-tert</i> -butoksykarbonylo)amino]-1-propanol (14)110
3.3. Metanosulfonian 3-[(<i>N-tert</i> -butoksykarbonylo)amino]-1-propylu (16).110
4. Synteza pochodnej 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksylozy111
4.1. <i>O</i> -metylo-2-deoksy-D-ryboza (27)111
4.2. <i>O</i> -metylo-2,5-dideoksy-5-jodo-D-ryboza (28)111
4.3. <i>O</i> -metylo-2,3,5-trideoksy-D-ryboza (29)112
4.4. <i>O</i> -metylo-3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksyloza (31)112
4.5. 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksyloza (19)
5. Synteza pochodnych 3-azydo-3-deoksy-D-heksoz113
5.1. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-α-D-glukofuranoza (33)
5.2. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3-okso-α-D-glukofuranoza (40)114
5.3. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-α-D-allofuranoza (41)114
5.4. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3- <i>O</i> -trifluorometanosulfonylo-α-D-furanoza – procedura ogólna
1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3- <i>O</i> -trifluorometanosulfonylo-α-D-gluko- furanoza (34)115
1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3- <i>O</i> -trifluorometanosulfonylo-α-D- allofuranoza (42)115

5.5. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3-azydo-3-deoksy-α-D-allofuranoza (34a)115
5.6. 1,2;5,6-di-O-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy-α-D-glukofuranoza (43)116
5.7. 3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd allilu – procedura ogólna 117
3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd allilu (36)117
3-azydo-3-deoksy-α-D-glukopiranozyd allilu117
5.8. 2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd allilu – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd allilu (37)
2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd allilu 119
2,4,6-tri- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butylodimetylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D- glukopiranozyd allilu
5.9. 3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd 4-pentenylu – procedura ogólna 119
3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (38) 120
3-azydo-3-deoksy-α-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (44) 120
5.10. 2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd 4-pentenylu – procedura ogólna
2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39) 121 2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45) 121 5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna

6.9. 2-acetamido-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranoza (52a) 127
6.10. Ester metylowy 2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy – przepis ogólny 127
Ester metylowy 2-amino-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy (51b) 127
Ester metylowy 2-acetamido-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy (52b) .128
6.11. Kwas 2-deoksy-D-glukitolo-6-sulfonowy – procedura ogólna128
Kwas 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-sulfonowy (53)128
Kwas N-acetylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-sulfonowy (54)128
7. Łączenie chronionego aglikonu AmB z cząsteczkami cukrów –procedura ogólna
7.1. Aglikon AmB połączony z 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksylozą (22) 129
7.2. Aglikon AmB połączony z 2,3,4,6-tetra-O-benzylo-D-glukopiranozą (23) 130
8. Tworzenie koniugatów makrolidów polienowych z 'parasolami molekularnymi'130
8.1. Ester aktywny TDBTU makrolidu polienowego – procedura ogólna130
<i>O</i> -(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)- <i>N</i> -Fmoc-amfoterycyna B (61)
<i>O</i> -(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)- <i>N</i> -Fmoc-nystatyna A ₁ (62)
8.2. Koniugaty typu dwuścienny parasol molekularny/ω-aminokwas/makrolid polienowy – procedura ogólna
N^3 -(<i>N</i> -amfoterycynoilo-3-aminopropanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilo-spermidyna (63)
N^3 -(<i>N</i> -amfoterycynoilo-4-aminobutanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilo-spermidyna (64)
N^3 -(<i>N</i> -amfoterycynoilo-6-aminoheksanoilo)- N^I , N^7 -di-deoksycholoilo-spermidyna (65)
N^3 -(<i>N</i> -amfoterycynoilo-8-aminooktanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilo-spermidyna (66)
N^3 -(<i>N</i> -nystatynoilo-3-aminopropanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilo- spermidyna (67)
N^{3} -(<i>N</i> -nystatynoilo-4-aminobutanoilo)- N^{I} , N^{7} -di-deoksycholoilo-spermidyna (68)
N^3 -(<i>N</i> -nystatynoilo-6-aminoheksanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilo-spermidyna (69)
N^3 -(<i>N</i> -nystatynoilo-8-aminooktanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilo- spermidyna (70)

N^{3} -(<i>N</i> -amfoterycynoilo-4-aminobutanoilo)- N^{l} , N^{7} -di-choloilospermidy (71)	na . 134
N^{3} -(<i>N</i> -amfoterycynoilo-8-aminooktanoilo)- N^{l} , N^{7} -di-choloilospermidy (72)	na . 134
N^3 -(N -nystatynoilo-4-aminobutanoilo)- N^1 , N^7 -di-choloilospermidyna	(73) . 135
N^3 -(N-nystatynoilo-8-aminooktanoilo)- N^1 , N^7 -di-choloilospermidyna	(74) . 135
Summary	. 136
Bibliografia	. 137
Dorobek naukowy	. 150

Wykaz stosowanych skrótów

AIBN	azobis(izobutyronitryl)			
AmB	amfoterycyna B, nazwa systematyczna: kwas			
	(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,12 <i>E</i> ,14 <i>E</i> ,16 <i>E</i> ,18 <i>S</i> ,19 <i>R</i> ,20 <i>R</i> ,21 <i>S</i> ,25 <i>R</i> ,2			
	30 <i>R</i> ,31 <i>R</i> ,33 <i>S</i> ,35 <i>R</i> ,37 <i>S</i> ,38 <i>R</i>)-3-[(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4-amino-3,5-			
	dihydroksylo-6-metyloksan-2-yl]oksy-19,25,27,30,31,33,35,37-			
	oktahydroksylo-18,20,21-trimetylo-23-okso-22,39-			
	dioksabicyklo[33.3.1]nonatriakonta-4,6,8,10,12,14,16-heptaeno-			
	38-karboksylowy			
Ar	grupa arylowa			
Bn	grupa benzylowa			
BnOH	alkohol benzylowy			
Boc	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa			
CD ₃ OD	tetra-deuterometanol			
CDI	N,N'-karbonylodiimidazol			
CSA	kwas kamforosulfonowy			
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinon			
DIAD	azodikarboksylan diizopropylu			
DIBALH	wodorek diizobutyloglinu			
DIPEA	diizopropyloetyloamina			
DMA	N,N-dimetyloacetamid			
DMF	N,N-dimetyloformamid			
dmgH	monoanion dimetyloglioksyny			
DMSO	dimetylosulfotlenek			
DPPA	azydek difenylofosforanowy (ang. diphenyl phosphoryl azide)			
ESI-MS	spektrometria mas z jonizacją z użyciem elektrorozpylania			
	(ang. electrospray ionisation mass spectrometry)			
Et	grupa etylowa			
Fmoc	grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa			
HMBC	ang. heteronuclear multiple bond coherence			
HOBt	1-hydroksybenzotriazol			
HSQC	ang. heteronuclear single quantum correlation			
Imd	grupa imidazolosulfonowa			
LC	chromatografia cieczowa (ang. liquid chromatography)			
mCPBA	kwas m-chloroperoksybenzoesowy			
MP	grupa <i>p</i> -metoksyfenylowa			
mPEG	glikol metoksypolietylenowy			
Ms	grupa mesylowa			

MsCl	chlorek mesylu		
NBS	<i>N</i> -bromosukcynoimid		
NEP	N-etylopirydyna		
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego		
	(ang. nuclear magnetic resonance)		
NSU-Fmoc	N-(9-fluorenylmetoksykarbonylo)oksysukcynimid		
NYS	nystatyna A1, nazwa systematyczna: kwas		
	(1 <i>S</i> ,15 <i>S</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i> ,18 <i>S</i>)-33-[(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4-amino-3,5-		
	dihydroksy-6-metylooksan-2-ylo]oksy-1,3,4,7,9,11,17,37-		
	oktahydroksy-15,16,18-trimetylo-13-okso-14,39-		
	dioksabicyklo[33.3.1]nonatriakonta-19,21,25,27,29,31-		
	heksaeno-36-karboksylowy		
PEG	polietoksyglikol		
Ph	grupa fenylowa		
PLC	preparatywna chromatografia cieczowa (ang. preparative liquid		
	chromatography)		
ppm	jednostka przesunięcia chemicznego (ang. parts per milion)		
ру	pirydyna		
PyBOP	heksafluorofosforan benzotriazol-1-yl-oksytripyrrolidyno-		
	fosfoniowy		
$\mathbf{R}_{\mathbf{f}}$	współczynnik opóźnienia, stosunek długości drogi substancji do		
	długości drogi fazy ruchomej		
TBS	grupa tert-butylodimetylosililowa		
TBSCI	tert-butylodimetylochlorosilan		
TDBTU	tetrafluoroboran N,N,N',N'-tetrametylo-O-(3,4-dihydro-4-okso-		
	1,2,3-benzotriazyn-3-yl)uroniowy		
TEA	trietyloamina		
TESOTf	trifluorometanosulfonian trietylosililowy		
Tf	grupa trifluorometanosulfonowa		
THF	tetrahydrofuran		
TIPS	grupa triizopropylosililowa		
TMNO	<i>N</i> -tlenek trimetyloaminy		
TMS	grupa trimetylosililowa		
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (ang. thin layer		
	chromatography)		
TS	grupa tosylowa		
UHP	wodorotlenek mocznika		
δ	przesunięcie chemiczne wyrażone w ppm		

Streszczenie

Od momentu opracowania terapii antybiotykowych największym problemem współczesnej medycyny jest drastyczny wzrost infekcji grzybiczych. Rozwój przemysłu farmaceutycznego i medycznego doprowadził m.in. do forsownego stosowania antybiotyków szerokiego spektrum, leków immunosupresyjnych, przeciwnowotworowych oraz hormonalnych. Idealny środek przeciwgrzybiczy powinien charakteryzować się: wysoka aktywnościa, szerokim spektrum działania, zdolnością do przezwyciężania oporności wielolekowej oraz być silnie grzybobójczy. Ponadto nie powinien indukować oporności i musi wykazywać niską toksyczność dla ludzi, przy jednoczesnej wysokiej toksyczności wobec grzybów. Żaden z dostępnych klinicznie leków przeciwgrzybiczych nie spełnia wszystkich tych wymagań, dlatego też istnieje ciągła potrzeba udoskonalania obecnych lub poszukiwania nowych leków.

W ramach badań, opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, przetestowano możliwości chemicznej modyfikacji części aminocukrowej aglikonu amfoterycyny B i nystatyny A1. Otrzymano chroniony aglikon AmB, posiadający grupę hydroksylowa na atomie wegla C19, który posłużył jako substrat w reakcji substytucji nukleofilowej oraz dehydracyjnej glikozylacji. Opracowano i zoptymalizowano warunki syntezy chronionych pochodnych cukrowych, bedacych dogodnymi substratami do reakcji z aglikonem makrolidowym. Sprawdzono możliwość przyłączenia następujących związków: metanosulfonianu 3-[(*N-tert*-butoksykarbonylo)amino]-1-propylu, *N-tert*butoksykarbonylo-3-fluoroaniliny, bromku 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-D-glukozy, 2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozy, 2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozy, 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-Dglukopiranozy, 2,3,4,6-tetra-O-benzylo-D-glukopiranozy oraz 3-azydo-2,3,6trideoksy-D-ksylozy. W reakcji z pochodna benzylowa glukozy, jak i pochodna ksylozy otrzymano dwie nowe, chronione pochodne amfoterycyny B. Ponadto zoptymalizowano metode syntezy koniugatów amfoterycyny B oraz nystatyny A_1 z 'parasolami molekularnymi', pochodnymi kwasu cholowego oraz opracowano warunki syntezy analogicznych związków z 'parasolami molekularnymi', pochodnymi kwasu deoksycholowego. Otrzymano dwanaście nieopisanych koniugatów makrolidów polienowych, które zostały przebadane pod katem aktywności przeciwgrzybowej i selektywnej toksyczności względem krwinek ludzkich, a wyniki tych badań zostały opublikowane.

Wszystkie związki poddano analizie strukturalnej z wykorzystaniem spektroskopii NMR oraz spektrometrii mas. Natomiast obecność koniugatów AmB z pochodnymi cukrowymi potwierdzono za pomocą widm dwuwymiarowych HSQC oraz HMBC.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Część literaturowa

1. Wstęp

Królestwo grzybów obejmuje ogromna różnorodność grup taksonomicznych należacych do różnych nisz ekologicznych, majacych inna strategie cyklu życiowego, a także morfologie. Jednak niewiele jeszcze wiadomo o ich prawdziwej bioróżnorodności. Szacuje się, że aż 1,5 milionów gatunków należy do tego królestwa, a tylko około 5% zostało oficjalnie sklasyfikowanych. Wiele z nich powoduje infekcje zwane grzybicami. Na początku XX wieku epidemie bakteryjne były główna przyczyna licznych zgonów na całym świecie, w przeciwieństwie do zakażeń grzybiczych, które były praktycznie pomijane. Dopiero od lat 70-tych ubiegłego wieku, w warunkach szerokiego stosowania przeciwbakteryjnej przeciwnowotworowej chemoterapii i oraz leków immunosupresyjnych, nastąpił drastyczny wzrost częstotliwości występowania grzybic układowych i obecnie to one stanowia jedno z ważniejszych zagrożeń dla zdrowia, nawet życia ludzi.¹ Reakcje organizmu w zetknieciu а z patogenami grzybowymi możemy podzielić na: reakcje alergiczne na białka grzybicze, reakcje na toksyny występujące w niektórych grzybach oraz infekcje, czyli grzybice.² Tylko niektóre gatunki grzybów powoduja choroby u zdrowych osób, większość z nich staje się patogenna tylko wtedy, gdy gospodarz ma osłabioną odporność.³ W związku z tym zwiększoną częstotliwość występowania infekcji grzybiczej obserwuje się u osób z niedoborem odporności, np. typu AIDS, pacjentów onkologicznych i diabetyków, pacjentów po przeszczepach narzadów, i innych inwazyjnych zabiegach chirurgicznych. Zdrowe osoby są natomiast podatne na powierzchniowe, skórne oraz podskórne zakażenia, w rzadkich dochodzi do infekcji układowych. Wiele zakażeń jest przypadkach spowodowanych przez patogeny oportunistyczne, które moga pochodzić, zarówno ze środowiska (zakażenie Cryptoccocus), jak i być endogenne (zakażenie Candida). Pomimo szeroko zakrojonych badań, które poświęcone są opracowaniu nowych strategii terapeutycznych, dostępna jest obecnie tylko niewielka liczba leków zwalczających zakażenia grzybicze. Główne grupy leków przeciwgrzybiczych i miejsca ich działania przedstawiono na **Rysunku 1**.^{2,4} W rzeczywistości, w praktyce klinicznej, w leczeniu układowych infekcji grzybiczych, używa się obecnie jedynie czterech klas tych leków. Należą do nich: 5-fluorocytozyna, antybiotyki z grupy makrolidów polienowych, leki syntetyczne i echinokandyny. grupy pochodnych triazolu Ponadto niektóre Z z nich mają bardzo waski zakres zastosowania. Flucytozyna ingeruje w synteze DNA, ma waskie spektrum działania i indukuje szybkie narastanie specyficznej oporności drobnoustrojów grzybowych.⁵ Pochodnie triazoli, takie jak Flukonazol i Vorikonazol, zakłócają biosyntezę ergosterolu poprzez hamowanie aktywności enzymu demetylazy lanosterolowej i maja działanie grzybostatyczne oraz indukują powstawanie oporności specyficznej i wielolekowej. Wykazano także, że leki te oddziałują z dużą ilością innych farmaceutyków stąd ich zastosowanie ogranicza się tylko do określonych przypadków.⁵ Spektrum przeciwgrzybowe echinokandyn bedacych inhibitorami syntazy $\beta(1\rightarrow 3)$ glukanu, jest stosunkowo wąskie. Kilka innych klas antymykotyków, takich jak morfoliny i alliloaminy, wykorzystywanych jest jako leki działające miejscowo, do leczenia grzybic powierzchniowych, ze względu na niską skuteczność badź też poważne, niepożadane skutki uboczne. Najskuteczniejsze w leczeniu grzybic układowych antybiotyki z grupy makrolidów polienowych, w tym szczególnie Amfoterycyna B, zawdzięczają swoją skuteczność zdolności do bezpośredniej interakcji z ergosterolem – głównym składnikiem błony komórkowej komórki grzybowej. Odpowiada on za płynność, asymetrię oraz integralność błony.6



Rysunek 1. Schemat działania leków przeciwgrzybiczych.²

Kontrola systemów eukariotycznych stanowi jeden z najtrudniejszych problemów w chemioterapii. Jednym spośród wciąż nierozwiązanych potrzeb klinicznych jest chemioterapia układowych zakażeń grzybiczych. Ogólnoustrojowa kandydoza, aspergiloza, histoplazmoza i kryptokokoza stanowią w dalszym ciągu poważny i rosnący problem.⁷ W ostatnich latach pojawiło się nowe zagrożenie ze względu na występowanie szczepów grzybów o oporności wielolekowej. Idealny środek przeciwgrzybiczy powinien wykazywać wysoka aktywność, posiadać szerokie spektrum działania oraz być silnie grzybobójczy. Nie powinien indukować oporności, majac jednocześnie zdolność do przezwyciężania oporności wielolekowej, a ponadto musi charakteryzować się niską toksycznością dla ludzi. Żaden z dostępnych klinicznie leków przeciwgrzybiczych nie spełnia wszystkich tych wymagań. Dlatego też trwają prace badawcze nad nowatorskimi lekami, które opierają się na dwóch strategiach. Pierwszą z nich jest poszukiwanie nowego celu, na który działałby wysoce selektywnie potencjalny lek, drugą natomiast jest chemiczna modyfikacja istniejących już leków. Najbardziej atrakcyjne w drugiej strategii wydają się być antybiotyki z grupy makrolidów polienowych. Posiadają one następujące zalety: wykazują wysoką aktywność grzybobójczą oraz szeroki jej zakres, a ponadto wrodzona lub nabyta odporność na te leki jest bardzo niska. Niestety maja też poważną wadę, ponieważ antybiotyki z tej grupy posiadają niższe (ale nie znikome) powinowactwo do cholesterolu, który jest ludzkim odpowiednikiem grzybowego ergosterolu. Powinowactwo to wyjaśnia dużą toksyczność oraz występowanie wielu efektów ubocznych podczas stosowania polienów jako leków przeciwgrzybiczych.^{7,8}

W związku z tym, liczne badania poświęcono wyjaśnieniu mechanizmu działania antybiotyków z grupy makrolidów polienowych w celu poprawy ich indeksu terapeutycznego oraz usunięcia ich neurotoksyczności poprzez odpowiednie modyfikacje chemiczne ich struktury.

2. Makrolidy polienowe

Makrolidy polienowe były pierwszymi lekami zastosowanymi w terapii przeciwgrzybiczej. Odkrycie amfoterycyny B i nystatyny A₁ w latach pięćdziesiatych ubiegłego wieku dostarczyło nowych możliwości terapeutycznych.^{9,10} W następnych latach odkryto ponad 200 kolejnych makrolidów polienowych posiadających aktywność przeciwgrzybicza. Sa one głównie wytwarzane przez promieniowce Streptomyces, a także przez niektóre gatunki grzybów. Kilka antybiotyków z grupy makrolidów polienowych jest obecnie dostępnych handlowo, w tym AmB i nystatyna A₁, które sa najczęściej stosowane klinicznie i zostały obszernie przebadane doświadczalnie. Większość antybiotyków z grupy makrolidowych polienowych wykazuje szerokie spektrum aktywności przeciwgrzybowej i ma działanie grzybobójcze. Główną wadą stosowanych klinicznie makrolidów polienowych jest ich wysoka toksyczność, szczególnie nefrotoksyczność. Leki te mogą powodować poważne skutki uboczne, takie jak uszkodzenie kanalików nerkowych, czy zakrzepowe zapalenie żvł.11

2.1. Struktura chemiczna makrolidów polienowych

Do poznania skomplikowanych struktur chemicznych złożonych makrolidów polienowych w znacznym stopniu przyczyniły się takie techniki, jak spektrometria mas oraz magnetyczny rezonans jądrowy.¹² Antybiotyki polienowe zbudowane są z dużych pierścieni laktonowych (20 – 44 członowych) zawierających od trzech do ośmiu niepolarnych, sprzeżonych wiazań podwójnych nadających cząsteczce charakter lipofilowy oraz grup hydroksylowych o charakterze hydrofilowym. Pierścień laktonowy połączony jest za pomocą wiązania glikozydowego z jednostką weglowodanową. Wśród klinicznie stosowanych makrolidów polienowych najczęściej występującą cząsteczką sacharydu jest mykozamina (3-amino-3,6-dideoksy-D-mannoza), zdecydowanie rzadziej do pierścienia laktonowego przyłączona jest perozamina (Rysunek 2). Tak zwane aromatyczne makrolidy polienowe zawierają w swojej strukturze dodatkowy podstawnik zawierający resztę kwasu *p*-aminobenzoesowego.¹³ Wiele antybiotyków polienowych swój amfoteryczny charakter zawdzięcza grupom: karboksylowej i aminowej, a ich ułożenie po tej samej stronie cząsteczki powoduje utworzenie jej polarnej "głowy". Dzięki temu moga one być elektroforetycznie obojętne w zakresie pH pomiędzy 5 a 9. Wśród makrolidów polienowych wyróżnić można takie wyjątki, jak m. in. perimycyna, która ma charakter zasadowy ze względu na obecność cząsteczki perozaminy (4-amino4,6-dideoksy-D-mannoza) przy jednoczesnym braku w jej strukturze grupy karboksylowej, czy pentamycyna nie mająca, zarówno jednostki cukrowej, jak i grupy karboksylowej.^{12,14}



Rysunek 2. Struktura chemiczna mykozaminy i perozaminy – aminocukrów występujących w makrolidach polienowych.

Ze względu na ilość sprzężonych wiązań podwójnych występujących w cząsteczce makrolidowe antybiotyki polienowe można sklasyfikować w następujące grupy: trieny, tetraeny, pentaeny oraz heptaeny. W **Tabeli 1** przedstawiono i opisano kilka przykładowych makrolidów polienowych należących do każdej z tych grup. W pełni nasycone związki organiczne zawierają tylko ściśle związane elektrony, a więc absorbują jedynie światło UV o bardzo krótkich długościach fali. Obecność nienasyconych wiązań w cząsteczce takich, jak wiązania podwójne, skutkuje stosunkowo luźno związanymi elektronami, co powoduje absorpcję występującą przy większych długościach fal. Koniugacja podwójnych wiązań zwiększa efekt batochromowy nienasycenia, który jest addytywny. Jeśli maksima absorpcji są wystarczająco przesunięte, to związki są wyraźnie kolorowe. Proces ten można obserwować na przykładzie próbek różnych makrolidów polienowych. Trieny są bezbarwne lub bardzo blado żółte, tetraeny są jasnożółte, pentaeny żółte, natomiast heptaeny są zdecydowanie pomarańczowe.¹²

Nazwa grupy	Nazwa makrolidu polienowego	Właściwości
Trieny	MM-8	Odkryty w 1965 roku, jest produkowany przez Streptomyces sp. i nie zawiera fragmentu węglowodanowego. Wykazuje właściwości cytotoksyczne. ¹²
	Proticyna	W odróżnieniu od innych makrolidów polienowych posiada doskonałą aktywność przeciwbakteryjną, a małą przeciwko grzybom i drożdżom. Izolowana ze szczepu <i>Baccilus</i>

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tabela 1. Przegląd właściwości niektórych makrolidów polienowych należących do różnych klas.

19

		<i>licheniformis</i> jest unikalna ze względu na obecność atomu fosforu w cząsteczce. ^{15,16}
Tetraeny	Pimarycyna	Jako jedyna spośród makrolidów polienowych ma w strukturze pierścień epoksydowy łączący atomy węgla C4 i C5. Pimarycyna wykazuje aktywność biologiczną względem pleśni, drożdży i bakterii. Wcześniej stosowano ją miejscowo w grzybicach skóry i błon śluzowych człowieka. ^{12,15}
Pentaeny	Aliomycyna	Jej struktura nie została jeszcze poznana, wiadomo natomiast, że zawiera atomy siarki i azotu. Wytwarzana przez <i>Streptomyces</i> <i>acidomceticus</i> . ¹²
	Filipina	Jest mieszaniną czterech lub pięciu cząsteczek niewiele różniących się między sobą strukturą chemiczną. Filipina III jest głównym składnikiem odpowiedzialnym za właściwości przeciwgrzybowe tego antybiotyku. ¹⁷
Heksaeny	Flavacid	Izolowany z grzybni <i>Actinomyces flavus</i> . Wraz z innym przedstawicielem heksaenów – fradicinem, mają odczyn lekko kwaśny. ^{12,17}
Heptaeny	Kandydyna	Jest mieszaniną trzech składników czynnych. Wszystkie należą do tak zwanej niearomatycznej podgrupy. Nazwa kandydyna została zarezerwowana dla głównego składnika kompleksu antybiotyku, podczas gdy dwa pozostałe mają nazwy: kandydynina i kandydoina. ¹⁸

2.1.1. Struktura chemiczna amfoterycyny B

Struktura chemiczna oraz stereochemia AmB zostały określone za pomocą metod rentgenowskiego badania monokryształów.¹⁹ Amfoterycyna B produkowana jest przez *Streptomyces nodosus* i pierwszy raz została wyizolowana w roku 1956 przez Stillera *et. al.*⁹ Należy do niearomatycznej podgrupy heptaenów, a jej masa molowa wynosi 923.49 g/mol. W 38-członowym pierścieniu laktonowym AmB występuje: 14 centrów stereogenicznych, siedem sprzężonych wiązań podwójnych, osiem grup hydroksylowych, jedna karboksylowa, a do pierścienia laktonowego przyłączona jest cząsteczka aminocukru – mykozaminy²⁰ w konformacji krzesłowej. Mykozamina połączona jest z pierścieniem laktonowym poprzez atom węgla C19 wiązaniem β -glikozydowym (**Rysunek 3**). W p*H* obojętnym amfoterycyna B występuje w postaci jonu obojnaczego (*ang.* zwitterion). Obecność pierścienia hemiketalowego w cząsteczce może tłumaczyć jej słabą rozpuszczalność, zarówno w wodzie, jak i w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych. Ze względu na swoją amfipatyczną naturę może oddziaływać na granicy faz woda – olej. Grupy hydroksylowe ulokowane z jednej strony cząsteczki tworzą część hydrofilową, natomiast układ sprzężonych wiązań podwójnych – część hydrofobową. Grupy karboksylowa wraz z aminową – znajdującą się we fragmencie cukrowym, tworzą polarną "głowę" makrolidu.^{1,12}



Rysunek 3. Struktura amfoterycyny B – przedstawiciela heptaenów.

2.1.2. Struktura chemiczna nystatyn

Nystatyna była pierwszym poznanym makrolidowym antybiotykiem polienowym. Wyizolowana przez Brown i Hazen¹⁰ w 1950 roku znalazła zastosowanie w leczeniu wielu form kandydoz spowodowanych przez drożdżaki. Należy do grupy tetraenów i jest produkowana przez szczep promieniowców *Streptomyces noursei*.²¹ Nystatyna jest mieszanina trzech aktywnych biologicznie i blisko spokrewnionych ze sobą związków nystatyn A1, A2 i A3. W zależności od odmiany szczepu Streptomyces noursei produkującego antybiotyk, można uzyskać inny stosunek nystatyn zawartych w mieszaninie. Odmiana 153 produkuje głównie nystatynę A1, która posiada najkorzystniejsze właściwości przeciwgrzybowe.²² Jej struktura chemiczna jest w dość znacznym stopniu analogiczna do struktury chemicznej AmB, różnice dotyczą układu poliolowego i polienowego. Nystatyna to makrolid składający się z 38-członowego pierścienia laktonowego, do którego przyłączona jest za pomocą wiązania β-glikozydowego do atomu węgla C19 cząsteczka mykozaminy.^{19,23} Pomiędzy atomami węgla C20-C27 znajdują się cztery sprzężone wiązania podwójne, następnie występuje wiązanie pojedyncze C28-C29, a pomiędzy atomami węgla C30-C33 znów

występują dwa sprzężone wiązania podwójne. Obecność wiązania pojedynczego w pierścieniu makrolaktonowym odpowiedzialna jest za jego labilność i umożliwia wewnątrzcząsteczkową translaktonizację prowadzącą do utworzenia cząsteczki izonystatyny A_1 .²⁴ NYS A_2 ma bardzo podobną strukturę do A_1 różni się jedynie brakiem grupy hydroksylowej na atomie węgla C10, a grupa karboksylowa znajduje się na atomie węgla C15, a nie C16. Natomiast NYS A_3 posiada w swojej strukturze dodatkową cząsteczkę aminocukru L-digitoksozę związaną z atomem węgla C35 (**Rysunek 4**).^{19,22}



Rysunek 4. Struktury nystatyn należących do grupy tetraenów.

2.2. Mechanizm działania przeciwgrzybowego makrolidów polienowych

Leki z grupy makrolidów polienowych swoją aktywność przeciwgrzybową zawdzięczają oddziaływaniu z ergosterolem, głównym składnikiem grzybowej błony komórkowej. Dzięki swej amfifilowej strukturze, mogą one penetrować dwuwarstwę fosfolipidową, z której składa się błona, powodując utworzenie w niej porów. W literaturze istnieje kilka hipotez

opisujących mechanizm działania makrolidów polienowych. W pierwszej z nich postuluje sie, że czasteczki makrolidu tworza kanał jonowy, w którym interakcje pomiędzy sąsiednimi molekułami stabilizują powstały pierścień.¹³ Druga hipoteza zakłada, iż jedna lub obydwie polarne grupy (karboksylowa i aminowa) oddziałuja z polarnymi grupami fosfolipidów,²⁵ natomiast w trzeciej rozważa się bezpośrednie wiązanie steroli zawartych w błonie komórkowej przez cząsteczkę makrolidu.²⁶ Dla większych makrolidów polienowych, takich jak amfoterycyna B, mechanizm tworzenia kanałów jonowych w błonie komórkowej opisywany jest następująco: kilka cząsteczek AmB (4-12) oddziałując ze sobą ulega agregacji i tworzy kanał o strukturze podobnej do beczki (ang. barrel-like structure), którego wnętrze ma charakter hydrofilowy. Utworzenie kanału umożliwia migracje jonów oraz małych czasteczek, takich jak glukoza i mocznik, to natomiast prowadzi do zmian w przepuszczalności błony, a to z kolej powoduje śmierć komórki (**Rysunek 5**).^{27,28} Choć doświadczalnie udowodniono interakcje polienów z ergosterolem to dokładny mechanizm ich działania jest wciąż niejasny.²⁷ Dlatego też Burke et al.²⁹ zaproponowali w ostatnich latach kolejny z możliwych mechanizmów oddziaływania AmB z ergosterolem tzw. gabke sterolowa (ang. sterol sponge). W modelu tym amfoterycyna B występuje głównie w postaci dużych agregatów na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej, które ekstrahują ergosterol z dwuwarstwy lipidowej i tworzą gąbkę sterolową.²⁹



Rysunek 5. Schemat działania polienów na błony zawierające sterole.6

Makrolidy polienowe wykazują jednak także powinowactwo do innego sterolu – cholesterolu, który jest odpowiednikiem grzybowego ergosterolu w komórkach ludzkich. Różnice w łączeniu się cząsteczek AmB z cholesterolem i ergosterolem są istotnym elementem prowadzącym do zrozumienia różnej siły działania antybiotyku w każdym z omawianych przypadków. Ergosterol zawarty w błonie komórkowej grzybów ułatwia włączenie się cząsteczek amfoterycyny B w strukturę membrany i utworzenie mniejszych kanałów o bardziej uporządkowanej strukturze, niż te powstające w błonie zawierającej cholesterol.²⁵

Jednakże nawet mniejsze powinowactwo AmB do cząsteczek cholesterolu stanowi podstawe jej wysokiej toksyczności i jest odpowiedzialne za wiele efektów ubocznych.³⁰ Sugeruje się, iż toksyczność ta powiązana jest z etapem agregacji czasteczek makrolidu polienowego w roztworach wodnych. Po rozpuszczeniu w wodzie, cząsteczki AmB tworzą trzy formy: rozpuszczalne w wodzie oligomery, nierozpuszczalne w wodzie agregaty oraz monomery.³¹ Wzajemne proporcje pomiędzy tymi formami zależą od stężenia antybiotyku. Bolard et al.32 stwierdzili, iż toksyczne efekty obserwowane w błonach zawierających cholesterol ograniczają się do oligomerów rozpuszczalnych w wodzie, podczas gdy monomery oraz nierozpuszczalne w wodzie agregaty AmB są nieaktywne w czasie tworzenia porów.³² Pomimo tego, iż AmB jest najbardziej skutecznym lekiem przeciwgrzybiczym, to jej waski indeks terapeutyczny nadal ogranicza jej użyteczność kliniczną. Amfoterycyna B podawana jest w przypadku grzybic układowych. Ze względu na swoja wysoka hydrofobowość i słabą absorpcję z układu żołądkowo-jelitowego, konieczne jest jej podawanie dożylne w postaci kompleksu z deoksycholanem sodu. Zmniejszona od AmB toksyczność wobec komórek ssaczych wykazuje liposomalna forma tego antybiotyku.⁶

Nystatyna, podobnie jak amfoterycyna B, zdolna jest do tworzenia kanałów jonowych w błonach komórkowych zwierających ergosterol. Jednakże ten sposób działania możliwy jest dopiero po przekroczeniu pewnej wartości krytycznej. Oligomery nystatyny zaczynają wtedy tworzyć pory w membranie, które umożliwiają wydobycie się z komórki jej zawartości. Poniżej stężenia krytycznego NYS wykazuje inny mechanizm działania na komórki grzybowe. Cząsteczki nystatyny wiążą się z warstwą powierzchniową błony lipidowej, która zawiera ergosterol i indukują w niej defekty strukturalne, które w konsekwencji zaburzają jej selektywną przepuszczalność i powoli zaburzają transmembranowy gradient potasu.^{13,33} Nystatyna jest stosowana jedynie jako lek doustny w leczeniu grzybic układu pokarmowego, gdyż jej wchłanianie przez błony śluzowe przewodu pokarmowego jest znikome.⁴ Ponadto jest też stosowana w leczeniu grzybic powierzchniowych, natomiast nie znajduje zastosowania w chemoterapii grzybic układowych.

2.3. Oporność mikroorganizmów na leki polienowe

Wzrost zachorowalności na AIDS, postęp w dziedzinie technologii terpeutycznych (w tym także przeszczepów narządów), stosowanie agresywnych chemoterapii przeciwbakteryjnych oraz zintesyfikowane zastosowanie urządzeń wewnątrznaczyniowych w przeciągu ostatnich dekad doprowadziły do dramatycznego wzrostu inwazyjnych zakażeń grzybiczych.^{34,35} Grzybice układowe powodowane przez lekooporne drobnoustroje grzybowe sa jedna z najczęstszych przyczyn zgonów u pacjentów z obniżoną odpornością i to one stanowią duże wyzwanie w praktyce klinicznej. Amfoterycyna B od dawna uważana jest za "złoty standard" w leczeniu poważnych infekcji grzybiczych.³⁶ Użycie liposomów i kompleksów lipidowych jako kapsułek służących do wprowadzenia antybiotyku do organizmu pacjenta, a także wykorzystanie antybiotyków z grupy azoli na przełomie lat 80 i 90 ubiegłego wieku stanowiły znaczący postęp w leczeniu infekcji grzybiczych. Jednakże poza możliwościa agresywniejszej profilaktyki i leczenia zakażeń doprowadziło to do pojawienia się organizmów lekoopornych.36,37 Oporność na leki z grupy makrolidów polienowych, takich jak amfotercyna B czy nystatyna, pojawiła się równolegle ze wzrostem infekcji spowodowanych przez tak zwane "nowe grzyby". Do grupy tej możemy zaliczyć następujące szczepy: C. lusitaniae, C. glabrata, C. guilliermondii, Trichosporon beigelii oraz niektóre gatunki: Fusarium, Scopulariopsis, Scedosporium. Wiele z tych grzybów wykazuje pierwotna, badź wewnętrzną oporność na działanie amfoterycyny B, w związku z czym może powodować inwazyjne zakażenia, które wiążą się z wysoką śmiertelnością.^{38,39} Mechanizm oporności lekowej komórek grzybowych możemy podzielić na pierwotny lub wtórny, który związany jest z wewnętrznymi, bądź nabytymi cechami patogenu. Także czynniki środowiskowe moga faworyzować kolonizacje oraz zastępowanie szczepów nowymi gatunkami lekoopornych grzybów.^{40,41} Dokładny mechanizm rozwoju oporności jest wciąż słabo poznany i zrozumiany. Jednakże zauważono, iż mikroorganizmy przeciwdziałają lekom grzybobójczym lub fungistatycznym na kilka sposobów: zmniejszaja ich akumulacje wewnatrz komórki grzybowej, zmniejszają powinowactwo leku do związku docelowego, zmieniają metabolizm w celu zrównoważenia wpływu antybiotyku.⁴ Jednakże to zmniejszenie lub całkowity brak zawartości ergosterolu w błonie komórkowej grzybów jest związany z opornościa bez wpływu na żywotność komórek. Braki te mogą być wynikiem mutacji w genach, które kodują niektóre enzymy zaangażowane w syntezę ergosterolu. Zarówno w szczepach Candida, jak i Cryptococcus, wykazujących odporność na działanie leków polienowych, stwierdzono iż zawartość ergosterolu jest niższa niż u szczepów wrażliwych. Alternatywnie wytrzymałość na antybiotyki polienowe może być również spowodowana zwiększoną aktywnością enzymu - katalazy, która zmniejsza podatność błony komórkowej grzyba na uszkodzenia oksydacyjne.^{40,42}

3. Chemiczne modyfikacje makrolidów polienowych

Praktycznie od początku zastosowania amfoterycyny B oraz nystatyny A1 jako leków przeciwgrzybowych trwają obszerne badania nad chemicznym zmodyfikowaniem struktury dostępnych antybiotyków w celu polepszenia ich indeksu terapeutycznego oraz rozpuszczalności w środowisku wodnym. Jednakże prowadzone badania nie należą do najprostszych. Ze względu na dużą liczbę różnorodnych grup funkcyjnych występujących w szkielecie makrolidu polienowego niska rozpuszczalność większości i W stosowanych rozpuszczalników sprawiają one wiele trudności podczas prowadzenia syntez chemicznych. Ponadto makrolakton jest podatny na reakcje zmydlania, grupy hydroksylowe na utlenienie, a reszta mykozaminy i pierścień hemiketalowy są wrażliwe na działanie niskiego pH.43

3.1. Modyfikacje makrolidów polienowych na grupie aminowej jednostki cukrowej

Zarówno amfoterycyna B, jak i nystatyna A₁ posiadają pierwszorzędową, wolną grupę aminową, która umożliwia stosunkowo łatwe i selektywne wprowadzenie różnych podstawników na atom azotu w wyniku reakcji substytucji nukleofilowej. Modyfikacje te są jednymi z prostszych, gdyż nie wymagają wprowadzania grup ochronnych na pozostałe grupy funkcyjne znajdujące się w cząsteczce makrolidu polienowego.

3.1.1. N-acylowe pochodne makrolidów polienowych

W *N*-acylowych pochodnych grupa aminowa zostaje zablokowana resztą acylową w wyniku bezpośredniej reakcji odpowiedniego bezwodnika lub chlorku kwasowego z antybiotykiem z grupy makrolidów polienowych. Pochodne te mogą zawierać grupy pochodzące od: kwasów mono- i dikarboksylowych o prostym lub rozgałęzionym łańcuchu alifatycznym, a także od aromatycznych kwasów karboksylowych i aminokwasów. Uzyskano w ten sposób serię pochodnych amfotercynyny B z następującymi podstawnikami: formylowym, acetylowym, propionylowym, sukcynylowym, ftalilowym oraz wiele innych (**Schemat 1**). Ponadto uzyskane w wyniku acylowania produkty były łatwe do izolacji, gdyż w wyniku strącania otrzymanych pochodnych eterem dietylowym otrzymywano pożądany, czysty produkt.^{44,45}

Znaczna liczba pochodnych *N*-acylowych odznacza się lepszą rozpuszczalnością w różnych mediach, takich jak rozpuszczalniki organiczne, a utworzenie soli pozwala na podwyższenie rozpuszczalności i stabilności

w roztworach wodnych w obszarze p*H* bliskim 7. W przypadku pochodnych utworzonych w reakcji z kwasami alifatycznymi, najlepsze wyniki osiągnięto dla pochodnych zawierających od jednego do dziewięciu atomów węgla w reszcie acylowej. Tworzenie *N*-acylowych pochodnych kwasów karboksylowych i polienów amfoterycznych takich, jak nystatyna i AmB prowadzi do usunięcia zasadowego charakteru grupy aminowej, a powstające związki charakteryzują się większą kwasowością niż wyjściowe substraty. Niestety otrzymane związki oprócz lepszej rozpuszczalności i stabilności charakteryzowały się także zdecydowanie niższą aktywnością biologiczną niż wyjściowe substraty.⁴⁶



R: -H, -CH₃, -CH₂I, -C₂H₄COOH, -C₆H₄COOH

Schemat 1. Otrzymywanie N-acylowych pochodnych na przykładzie amfoterycyny B.

Ze względu na niską aktywność *N*-acylowanych pochodnych Wright *et al.*⁴⁷ podjęli próbę otrzymywania aminoacylowych pochodnych zakładając, że pierwszorzędowa grupa aminowa jest niezbędna do zachowania aktywności przeciwgrzybowej. Jako reagentów używano estrów aktywnych aminokwasów. Początkowo grupę aminową chroniono za pomocą osłony: *N*-trifluoroacetylowej lub *N*-trichloroetylokarbonylowej, jednakże ich usuwanie okazało się niemożliwe. Grupę ochronną zamieniono na Fmoc, co pozwoliło na otrzymanie wielu pochodnych aminoacylowych, które następnie przeprowadzono w lepiej rozpuszczalne estry metylowe poprzez działanie na nie jodkiem metylu. Otrzymano w ten sposób *N*-histydylo-, *N*-lizylo-, *N*-ornitylo- czy *N*-glicylo-pochodne AmB. Jednakże wyselekcjonowany z tej grupy związek optymalny *N*-D-ornityloamfoterycyna B pomimo lepszej selektywnej toksyczności okazał się silnie cerebrotoksyczny.⁴⁷

Z kolei Czerwiński *et al.*⁴⁸ otrzymywali pochodne N-(N',N'-dimetylo)aminoacylowe AmB, NYS, aureofacyny i perymicyny dwiema metodami. Standardową, działając na cząsteczkę antybiotyku z grupy makrolidów polienowych otrzymanym uprzednio estrem aktywnym N-hydroksysucynimidylowym N,N-dimetylowanego aminokwasu, bądź bezpośrednio w wyniku reakcji estru lub amidu makrolidu polienowego i N,N-dimetylowanego aminokwasu w obecności

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

azydku difenylofosforanowego (DPPA). Wykorzystanie azydku skracało dwukrotnie czas syntezy, a otrzymane wydajności zbliżone były do metody z użyciem estru aktywnego.⁴⁸

Najatrakcyjniejsze ze względu na swoją aktywność okazały się związki, które były pochodnymi *N*-aminoacylowymi amfoterycyny B o tzw. dużej zawadzie przestrzennej, otrzymane przez Borowskiego *et al.*⁴⁹ Posiadały one dość niską toksyczność względem komórek ssaczych i wciąż wysoką względem grzybowych. Do syntezy wyżej wymienionych pochodnych wykorzystano także metodę estrów aktywnych utworzonych przy pomocy mieszaniny DCC/NSU, a funkcję aminową chroniono za pomocą ugrupowania Fmoc. Grupa aminowa tych pochodnych była zablokowana przez reszty aminokwasów, posiadających co najmniej jedno ugrupowanie aminowe. Grupy te o różnej rzędowości umiejscowione były w pozycji alfa, beta, gamma bądź dalszych w stosunku do grupy karboksylowej aminokwasu. Zawadę steryczną stanowiły, zarówno wielowęglowe łańcuchy proste lub rozgałęzione, jak i układy pierścieniowe (często zawierające heteroatomy).⁴⁹

3.1.2. N-alkilowe pochodne makrolidów polienowych

Pochodne *N*-alkilowe makrolidów w przeciwieństwie do *N*-acylowych zachowują zasadowy charakter atomu azotu znajdującego się w grupie aminowej mykozaminy. Wykorzystując reakcję redukcyjnego aminowania aldehydów i ketonów oraz addycję Michaela z *N*-podstawionymi maleimidami otrzymuje się w stosunkowo prosty sposób *N*-alkilowe pochodne makrolidów polienowych.

Czerwiński et al.⁵⁰ opisali metodę otrzymywania pochodnych maleimidowych amfoterycyny B. W wyniku addycji grupy aminowej do N-podstawionych maleimidów otrzymano pochodne I-III (Schemat 2). Jedynie pochodna II charakteryzowała się aktywnościa przeciwgrzybowa porównywalną do wyjściowego substratu i jednocześnie niską toksycznością dla komórek ludzkich. Pozostałe dwie pochodne posiadały niższą, badź zdecydowanie niższą aktywność przeciwgrzybową w porównaniu z cząsteczką AmB.⁵⁰ Nie były to jedyne zsyntezowane w ten sposób pochodne. Takatori et al.⁵¹ otrzymali kolejne pochodne maleimidowe, które do atomu azotu miały przyłączone następujące podstawniki: alkilowe 0 łańcuchu prostym i rozgałęzionym, alkilowe cykliczne, arylowe oraz 1,2,3-tiadiazolowe. Otrzymane pochodne zostały przebadane pod kątem aktywności przeciwgrzybowej. Jednakże autorzy nie znaleźli bezpośredniej zależności pomiędzy aktywnością a długością łańcucha i charakterem hydrofobowym otrzymanych pochodnych.51



Schemat 2. Pochodne *N*-alkilowe AmB otrzymane w reakcji addycji Michaela grupy aminowej mykozaminy do *N*-podstawionych maleimidów.⁵⁰

Natomiast Carreira *et al.*⁵² wykorzystując metodę redukcyjnego aminowania otrzymali szereg *N*,*N*-dialkilowanych pochodnych AmB, które według założeń powinny posiadać lepsze właściwości terapeutyczne. Do mieszaniny amfoterycyny B z nadmiarem *N*-chronionego aminoaldehydu w obecności cyjanoborowodorku sodu wkraplano stężony kwas solny. Produkt izolowano poprzez wytrącenie go eterem dietylowym. Tak przeprowadzone redukcyjne aminowanie umożliwiło bezpośrednie otrzymanie *N*,*N*-dialkilowanych pochodnych amfoterycyny B. Z ośmiu otrzymanych pochodnych jedynie *N*,*N*-di(3-aminopropylo)AmB wykazywała wyższą aktywność przeciwgrzybową i niższą hemotoksyczność w porównaniu z macierzystym antybiotykiem (**Schemat 3**).⁵²



Schemat 3. Synteza N,N-di(3-aminopropylo)amfoterycyny B.

Dowiedziono także zależności pomiędzy długością łańcucha węglowego połączonego z atomem azotu, a aktywnością przeciwgrzybową otrzymanych związków. Okazało się, że im dłuższy łańcuch węglowy pochodnej *N*-alkilowej tym słabsze działanie antybiotyku polienowego, natomiast udział dużej ilości pierwszorzędowych grup aminowych nie wpływa na wzrost aktywności przeciwgrzybowej związku.⁴³

W wyniku reakcji redukcyjnego aminowania otrzymano także pochodne Jako substratów użyto różnie podstawionych aldehydów benzylowe. benzoesowych, zawierających w pierścieniu aromatycznym, zarówno atomy halogenu, jak i grupy: aminowa, metoksylowa czy hydroksylowa. Otrzymane odznaczały sie zdecydowanie rozpuszczalnościa produkty lepszą w rozpuszczalnikach organicznych, jednakże były nierozpuszczalne w środowisku wodnym. Najbardziej obiecująca aktywność przeciwgrzybowa wykazywały pochodne posiadające atom halogenu w pozycji para do grupy karbonylowej.53

3.1.3. N-glikozylowe pochodne makrolidów polienowych

Kolejna grupa związków, zasługującą na uwagę, są pochodne N-glikozylowe makrolidów polienowych. Są to związki powstałe w wyniku przegrupowania Amadori makrolidu polienowego zawierającego wolną, alifatyczną grupę aminową z cząsteczką węglowodanu lub jej pochodną (Schemat 4).⁴³ Poza czasteczkami AmB i NYS wolna, alifatyczna grupe aminowa posiadają cząsteczki: kandycydyny, pimarycyny, mykoheptyny, leworyny oraz trichomycyny, z którymi również udało się otrzymać N-glikozylowe pochodne. Do tego celu użyto cukrów takich, jak: glukoza, fruktoza, mannoza, ryboza, i kwas glukuronowy.54 Otrzymano także pochodnych *N*-glikozylowych sole i N-metyloglukaminowej, które wykazywały o wiele lepszą rozpuszczalność w wodzie niż pozostałe związki. Aktywność przeciwgrzybowa otrzymanych pochodnych była podobna do wyjściowego antybiotyku z grupy makrolidów polienowych, jednak nie wykazywały one wzrostu selektywności działania.55 Najbardziej interesujaça pochodna Z punktu widzenia aktywności przeciwgrzybowej, otrzymaną w wyniku przegrupowania Amadori, był ester metylowy N-metylo-N-D-fruktozyloamfoterycyny B. Okazało się bowiem, iż ta pochodna pomimo dwukrotnie niższej aktywności przeciwgrzybowej charakteryzuje się o wiele niższą toksycznością. Niestety niska wydajność chemiczna prowadzonych reakcji uniemożliwia syntezę omawianego związku na skalę techniczną, a złe parametry farmakokinetyczne nie pozwoliły na osiągniecie etapu badań klinicznych.56



Schemat 4. Mechanizm przegrupowania Amadori na przykładzie cząsteczki glukozy i pierwszorzędowej grupy aminowej amfoterycyny B.

W przegrupowaniu Amadori grupa aminowa cząsteczki mykozaminy reaguje bezpośrednio z anomerycznym atomem węgla dołączanego aminocukru (**Schemat 4**). Natomiast Careira *et al.*⁵⁷ zaproponowali przyłączenie do cząsteczki mykozaminy łącznika, do którego następnie mogła być doczepiona cząsteczka cukru. Wykorzystanie glikokoniugacji dawało możliwość syntezy łączników o różnej długości łańcucha węglowego oraz pozwalało na dołączenie cząsteczki cukru do różnych atomów węgla. Jednakże cała synteza obejmowała o wiele więcej etapów niż przegrupowanie Amadori. Strategia ta została zastosowana do syntezy łącznika piperazynowego, do którego przyłączono sulfonowy analog glukozy oraz glukozaminy (**Schemat 5**). Otrzymany produkt posiadał aktywność zbliżoną do wyjściowego substratu.⁵⁷



Schemat 5. Wykorzystanie glikokoniugacji jako metody tworzenia pochodnych N-glikozylowych.

Do utworzenia kolejnych N-glikozylowych pochodnych wykorzystano arabinogalaktan.⁵⁸ Wybór tegoż związku nie był przypadkowy. Arabinogalaktan (AG) jest bowiem silnie rozgałęzionym, naturalnym polisacharydem odznaczającym się dużą rozpuszczalnością w wodzie. Otrzymuje się go poprzez ekstrakcję z drzewa Larix i jest dostępny jako gotowy produkt o 99.9% czystości. Wysoka rozpuszczalność w wodzie, biokompatybilność i biodegradowalność oraz łatwa koniugacja z lekami w środowisku wodnym czynią ten związek atrakcyjnym nośnikiem leków.58 Synteza koniugatów obejmowała utlenienie czasteczki AG za pomoca nadjodanu potasu, następnie utworzenie wiazania iminowego z AmB (powstaje zasada Schiffa V) i jej redukcje borowodorkiem sodu, co prowadziło do otrzymania pożądanej pochodnej (Schemat 6). koniugat AmB-AG charakteryzował porównywalnymi Otrzymany się wartościami MIC wobec C. albicans i około 40-krotnie mniejszą toksycznością wobec komórek mysich niż AmB.58,59,60



Schemat 6. Otrzymywanie koniugatów arabinogalaktanu z cząsteczką AmB poprzez tworzenie wiązania iminowego i jego redukcję.⁵⁹

3.2. Modyfikacje makrolidów polienowych na grupie karboksylowej

Grupa karboksylowa i aminowa tworzą "polarną głowę" cząsteczki makrolidu polienowego oraz umożliwiają tworzenie zwitterjonu w roztworach wodnych. Większość modyfikacji grupy karboksylowej przeprowadzono podczas syntezy *N*-pochodnych makrolidów polienowych. Prac dotyczących modyfikacji jedynie grupy karboksylowej jest niewiele i zawężają się do publikacji z lat 70 – 90 ubiegłego wieku.

3.2.1. Estry makrolidów polienowych

Wykorzystując jako substraty antybiotyki z grupy makrolidów polienowych posiadające charakter amfifilowy, można w łatwy sposób otrzymać z nich syntetyczne estry alkilowe, używając do reakcji określonego antybiotyku i nadmiaru diazoalkanu. Środowisko zasadowe reakcji pozwala na ograniczenie tworzenia się produktów ubocznych.⁶¹ Utworzenie pochodnych estrowych w amfoterycznych makrolidach polienowych prowadzi do wzrostu ich zasadowości. Estry alkilowe są krystalicznymi ciałami stałymi o kolorze od żółtego do brązowego. Zazwyczaj są one nierozpuszczalne w wodzie i w wodnych roztworach alkaliów ze względu na zablokowaną grupę kwasową, a także w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych, takich jak etery dietylowy i naftowy oraz benzen. Ze względu na aktywność mikrobiologiczną, estry alkilowe posiadają zasadniczo ten sam zakres działania jak naturalne antybiotyki polienowe. Są aktywne wobec wielu gatunków patogennych grzybów, zwłaszcza *Candida albicans*, drożdży i pierwotniaków. Toksyczność estrów alkilowych antybiotyków polienowych jest praktycznie w każdym

przypadku niższa od związków wyjściowych. Potencjalna toksyczność polienów zależy w znacznym stopniu od ich bardzo małej rozpuszczalności w wodzie w środowisku fizjologicznym.^{61,62} Ze względu na niewielką rozpuszczalność estrów w wodzie, przeprowadzano je w sole. Otrzymano chlorowodorki alkilowych estrów, takich jak estry metylowe, etylowe czy propylowe AmB i NYS A₁. Związki te charakteryzują się aktywnością przeciwgrzybową porównywalną do aktywności substancji wyjściowej, mają natomiast znacznie lepszą rozpuszczalność w wodzie. W rezultacie produkty te są użyteczne w przypadku, gdy wprowadzanie czynników przeciwgrzybowych w środowisku niewodnym mogłoby mieć niepożądane skutki uboczne.^{63,64,65}

3.2.2. Amidy, hydrazydy oraz pochodne mocznikowe makrolidów polienowych

Kilka lat po otrzymaniu estrów makrolidów polienowych, naukowcy rozpoczęli prace nad poszukiwaniami nowych pochodnych, które posiadałyby lepszą aktywność przeciwgrzybową i niższą toksyczność w stosunku do komórek ludzkich. Ich uwaga skupiła się na pochodnych amidowych, które uzyskiwano w reakcji amin z grupa karboksylowa makrolidu polienowego w obecności DPPA i trietyloaminy, badź przy użyciu mieszaniny DCC/HOBt. Otrzymano amidy łańcuchem alkilowym zawierającym następujące grupy funkcyjne: Z hydroksylową (VI), estrową (VII), aminową (VIII) oraz amidową (IX) (Schemat 7). Jednakże zsyntezowane związki nie posiadały lepszej, selektywnej toksyczności, a ich rozpuszczalność była porównywalna z pochodnymi estrowymi.^{66,67,68} Pomimo niezadowalających rezultatów badań biologicznych otrzymanych dla związków amidowych, kilkanaście lat później naukowcy zaprojektowali i zsyntezowali związki hybrydowe. Koniugaty te były amidowymi pochodnymi AmB i benzoksyboranów, niestety nie posiadały one lepszej aktywności przeciwgrzybowej ani selektywnej toksyczności.69

Borowski *et al.*⁷⁰ otrzymali pochodne hydrazydowe stosując identyczną strategię syntetyczną. Do roztworu makrolidu polienowego dodawano 1-amino-4metylopiperazynę oraz mieszaninę TEA/DPPA służącą do aktywacji grupy karboksylowej. Otrzymano hydrazydy amfoterycyny B (**X**), nystatyny A₁, aureofacyny i kandycydyny, przy czym najlepszą aktywność wykazywała pierwsza z wymienionych pochodnych (**Schemat 7**).⁷⁰



Schemat 7. Otrzymywanie amidów i hydrazydów polienów przy użyciu DPPA.

3.3. Modyfikacje aglikonu makrolidów polienowych

Są to najtrudniejsze do przeprowadzenia modyfikacje chemiczne ze względu na ilość i różnorodność grup funkcyjnych występujących w cząsteczce makrolidu polienowego. Często wymagają wieloetapowych syntez i stosowania selektywnych ochron poszczególnych grup funkcyjnych. Jednocześnie modyfikacje te należą do najbardziej interesujących ze względu na ilość możliwych zmian w pierścieniu makrolaktonowym.

3.3.1. Modyfikacje struktury makrolidów polienowych na atomach węgla C13 oraz C14

Atom węgla C13 wchodzi w skład ugrupowania hemiketalowego powstałego w wyniku ataku grupy hydroksylowej znajdującej się na atomie węgla C17 na grupę karbonylową (C13).

Czerwiński et al.71 rozważając wpływ pierścienia hemiketalowego na aktywność przeciwgrzybową cząsteczki AmB podjęli próbę modyfikacji grupy wyniku hydroksylowej atomie wegla C13. działania na W O-metylohydroksyloaminy na amfoterycynę B może dojść do ataku w dwóch miejscach: w pierścieniu hemiketalowym oraz laktonowym. Autorzy nie obserwowali naruszenia pierścienia makrolaktonowego, a głównym produktem O-metylooksym. Degradacja pierścienia hemiketalowego reakcii był doprowadziła do spadku aktywności pochodnej w stosunku do wyjściowego antybiotyku.71

Kolejną modyfikacją było utworzenie pochodnej ketalowej oraz eliminacja cząsteczki wody, co prowadziło do powstania wiązania podwójnego pomiędzy atomami węgla C13-C14. Obydwie te reakcje wymagały ochrony grup: aminowej, karboksylowej oraz hydroksylowych. Proces tworzenia pierścienia ketalowego przeprowadzono działając na cząsteczkę amfoterycyny B dimetoksymetanem w środowisku kwasu kamforosulfonowego. W wyniku reakcji otrzymano ester metylowy *N*-acetylo-13-*O*-metylo-AmB. Niestety źle dobrane grupy ochronne uniemożliwiły otrzymanie pożądanych, nieosłoniętych produktów.^{72,73}

Taylor *et al.*^{74,75} otrzymali następujące ketale nieochronionej AmB: 13-*O*-metylo- (**XI**), 13-*O*-(2-hydroksyetylo)- (**XII**), 13-*O*-propylo-AmB (**XIII**). Ponadto otrzymali etylotioketal (**XIV**)⁷⁴ oraz pochodną anhydro C13-C14 amfoterycyny B (**XV**).⁷⁵ Do ochrony grupy aminowej makrolidu wykorzystano osłonę Fmoc, natomiast karboksylową przekształcono w ester allilowy (**Schemat 8**). Niestety jedynie pochodna **XI** wykazywała się aktywnością biologiczną porównywalną do wyjściowego antybiotyku, pozostałe charakteryzowały się znacznym spadkiem bioaktywności.⁷⁵





XIV

RO:-SCH2CH2
Wspomniana wcześniej pochodna anhydro C13-C14 amfoterycyny B (**XV**) została otrzymana poprzez dehydratację hemiketalu przy użyciu odczynnika sililującego trifluorometanosulfonianu trimetylosililowego. Reakcji tej towarzyszyło sililowanie wszystkich grup hydroksylowych znajdujących się w cząsteczce. Grupy trimetylosililowe usunięto fluorowodorem w pirydynie.^{74,75} Pochodna anhydro **XV** posłużyła jako substrat w reakcji wprowadzania atomu fluoru w pozycję C14. Do reakcji użyto elektrofilowego odczynnika fluorującego o nazwie Selektfluor (**Schemat 9**).⁷⁶



Schemat 9. Tworzenie pochodnych anhydro- i C14-fluoro-AmB.

Ponadto w wyniku reakcji kwasu *m*-chlorobenzoesowego z grupą hydroksylową przyłączoną do atomu węgla C13 makrolidu otrzymano pochodną estrową AmB, a działanie kompleksem fluorowodoru w pirydynie umożliwiło wprowadzenie atomu fluoru w pozycję C13 AmB.⁷⁷

3.3.2. Modyfikacje syntetyczne na atomie węgla C16 amfoterycyny B - redukcja grupy karboksylowej

Jedną z pierwszych funkcjonalizacji grupy karboksylowej było utworzenie 16-dekarboksy-16-hydroksymetylowej pochodnej amfoterycyny B. Przeprowadzenie procesu redukcji grupy karboksylowej wymagało ochrony grupy aminowej. Wybór padł na grupę Fmoc labilną w lekko zasadowym środowisku. W następnym etapie grupę karboksylową zestryfikowano za pomocą diazometanu, a hemiketalowy atom węgla C13 przekształcono w ketal metylowy. Tak ochronioną pochodną AmB zredukowano za pomocą borowodorku sodu i uzyskano pożądany produkt z wydajnością 58%. Po deprotekcji wszystkich grup ochronnych otrzymano 16-dekarboksy-16-hydroksymetyloamfoterycynę B.⁷⁷

Natomiast Driver et al.78 przekształcali grupe karboksylowa AmB w grupę karbonylowa. Pierwszym etapem syntezy było wprowadzenie osłon a wszystkie grupy funkcyjne (poza karboksylową) i utworzenie pochodnej C13-C14 AmB. Następnie działając chloromrówczanem anhydro 2-tiopirydyniowym na ochroniona pochodna **XVIIb** otrzymywano ester aktywny, który traktowano odczynnikiem Grignarda, co prowadziło do pożądanych ketonów XIX-XXII. Jedynie W przypadku reakcji Z bromkiem metylomagnezowym zaobserwowano tworzenie się produktu ubocznego, którym był trzeciorzedowy alkohol. Dlatego też keton metylowy otrzymano z pochodnej XVIIa, która okazała się mniej reaktywna niż pochodna XVIII (Schemat 10).⁷⁹



Schemat 10. Modyfikacje grupy karboksylowej na atomie węgla C16 prowadzące do pochodnych karbonylowych na atomie węgla C16 AmB.

Żadna z powyżej opisanych modyfikacji grupy karboksylowej nie naruszała wiązania pomiędzy atomami węgla C16-C41. Ostatnio Burke *et al.*⁸⁰ wykazali, iż działanie DPPA wyraźnie sprzyja stereospecyficznemu przegrupowaniu Curtiusa, które prowadzi do rozerwania wiązania węgiel-węgiel (C16-C41). Powstający izocyjanian na skutek wewnątrzcząsteczkowego ataku grupy hydroksylowej z atomu węgla C15 natychmiast tworzy pierścień oksazolidynowy. Nieoczekiwanie dla autorów pierścień ten jest reaktywny i ulega otwarciu w łagodnych warunkach pod działaniem amin pierwszorzędowych tworząc pochodne mocznikowe (**Schemat 11**). Związki **XXIII** i **XXIV** wykazują ciekawe właściwości przeciwgrzybowe i są mniej toksyczne niż AmB *in vivo*, ponadto krótka ścieżka syntetyczna, prowadząca do otrzymania tych produktów z dobrą wydajnością, czyni te związki wysoce atrakcyjne do syntezy na skalę przemysłową.^{80,81}



Schemat 11. Synteza pochodnych mocznikowych AmB.

3.3.3. Modyfikacje syntetyczne na atomie węgla C19 amfoterycyny B

Już w 1988 roku naukowcy⁷² po raz pierwszy rozszczepili wiązanie glikozydowe i oddzielili cząsteczkę mykozaminy od pierścienia makrolaktonowego AmB. Reakcję przeprowadzono na całkowicie chronionej cząsteczce amfoterycyny B przy użyciu DDQ. Jednakże nie kontynuowano badań nad aktywnością i dalszymi modyfikacjami aglikonu aż do 2007 roku kiedy to Burke *et al.*⁸² otrzymali pochodne AmB z odłączoną jednostką mykozaminy **XXVI** i **XXVII**, a następnie przebadali je pod kątem ich aktywności biologicznej. Modyfikacje prowadzące do rozerwania wiązania glikozydowego nie należą do najprostszych. Po pierwsze, jak już wcześniej wspomniano, cząsteczka amfoterycyny B jest labilna w drastycznych warunkach reakcji, po drugie synteza wieloetapowa. Niektóre Z szeregu przeprowadzonych ta iest reakcii przedstawiono na Schemacie 12. W celu sprawdzenia, wpływu różnych grup funkcyjnych na oddziaływanie z dwuwarstwa lipidowa utworzono trzy pochodne. W pierwszej z nich usunięto cząsteczkę mykozaminy (XXVI), w drugiej grupę karboksylowa na atomie wegla C16 przekształcono w grupę metylowa (XXVII). Natomiast w trzeciej pochodnej usunięto jednostkę cukrową oraz przekształcono grupę karboksylową w metylową na atomie węgla C16 (XXVIII). Zarówno związek **XXVI**, jak i **XXVIII** nie wykazywały aktywności przeciwgrzybowej w stężeniach od pięciu do dziesięciokrotnie większych niż minimalne stężenie hamujące dla amfoterycyny B. Ponadto pochodna XXVII okazała się czterokrotnie mniej aktywna niż AmB, zarówno przeciwko szczepowi Candida albicans, jak i Saccharomyces cerevisiae. Sugeruje to, ważną rolę nie tylko jednostki mykozaminy, ale także grupy karboksylowej w tworzeniu kanałów jonowych w błonach komórek grzybowych. Pochodna, w której brak cząsteczki mykozaminy nie wiąże się tak łatwo z powierzchnią dwuwarstwy lipidowej. Potwierdzałoby to stwierdzenie, że specyficzne interakcje pomiedzy naładowanymi grupami funkcyjnymi (karboksylowa i aminowa) powodują łatwiejsze wiązanie cząsteczki polienu z powierzchnią dwuwarstwy lipidowej.^{26,82}



Schemat 12. Modyfikacje cząsteczki amfoterycyny B na atomach węgla C16 i/lub C19.

3.3.4. Modyfikacje na atomie węgla C'2 makrolidów polienowych

Burke *et al.*⁸³ kontynuując badania nad strukturalnymi modyfikacjami aglikonu amfoterycyny B wykorzystali chroniony pierścień makrolaktonowy **XXX** i przyłączyli do niego jednostkę azydocukrową **XXIX**. Utworzenie wiązania glikozydowego z jednostką 2,3,6-trideoksy-3-azydocukru pozwoliło na otrzymanie związku **XXXI (Schemat 13)**. Zsyntezowana pochodna nie posiadała grupy hydroksylowej na atomie węgla C'2, ale zachowała amfifilowy charakter, podobnie jak cząsteczka AmB. Związek **XXXI** posiada aktywność przeciwgrzybową i łączy się z cząsteczką ergosterolu. Nie tworzy natomiast wiązania z cholesterolem, co powinno znacznie zwiększyć jego wskaźnik terapeutyczny *in vivo.*⁸³





Schemat 13. Przyłączanie cząsteczki cukru do aglikonu amfoterycyny B.

Otrzymano także epimer amfoterycyny B na atomie węgla C'2. Proces ten nie wymagał "odcinania" mykozaminy od pierścienia laktonowego, a jedynie selektywnej osłony grup funkcyjnych znajdujących się w cząsteczce, z następczym utworzeniem estru kwasu *p*-nitrobenzoesowego w obecności DIAD (azodikarboksylan diizopropylu). Z uwagi na mechanizm reakcji estryfikacji następowała inwersja konfiguracji na atomie węgla C'2. Usunięcie grup ochronnych pozwoliło na otrzymanie epimeru na atomie węgla C'2 amfoterycyny B.^{84,85}

3.4. Inne pochodne makrolidów polienowych

Naukowcy poszukując koniugatów polepszających rozpuszczalność makrolidów polienowych oraz ich właściwości farmakokinetyczne skierowali swoje zainteresowanie na tworzenie koniugatów z polimerami. Sedlak et al.86 jako pochodne makrolidów polienowych pierwsi otrzymali Z glikolem metoksypolietylenowym (mPEG). mPEG jest praktycznie nietoksyczny i w łatwy sposób jest usuwany z organizmu przez nerki. Poza tym jego hydrofilowy charakter zapewnia lepsza rozpuszczalność hydrofobowym cząsteczkom tworząc np. stabilizowane układy koloidalne. W wyniku reakcji grupy aminowej cząsteczki AmB z estrem aktywny glikolu metoksypolietylenowego otrzymano pochodna amfoterycyny B XXXII (Schemat 14).⁸⁶ Opracowano także otrzymywanie koniugatów AmB z polietyloglikolem (PEG) wykorzystując łączniki ulegające in vivo hydrolizie, która prowadzi do uwolnienia wolnej cząsteczki AmB. Wykorzystując przyłączanie polimerów za pomocą łącznika do cząsteczki leku w łatwy sposób można zmienić farmakokinetykę otrzymywanych produktów. Modyfikując łącznik np. poprzez wprowadzenie grup o dużych wymaganiach sterycznych możemy wpływać na szybkość jego hydrolizy, a tym samym osiągać większą skuteczność leku. Ideę tworzenia pochodnych z wykorzystaniem polimerów i łącznika przedstawiono na przykładzie pochodnej AmB XXXIII na Schemacie 14.87





Schemat 14. Tworzenie koniugatów amfoterycyny B z polimerami PEG.

Znajomość interakcji molekularnych pomiędzy AmB i sterolami ma zasadnicze znaczenia dla ustalenia toksyczności związku oraz powodowanych przez niego skutków ubocznych. Murata *et al.*⁸⁸ skupili się na badaniu interakcji pomiędzy AmB-sterol i cząsteczkami AmB-AmB w biomembranie. W tym celu utworzyli kilka koniugatów amfoterycyny z ergosterolem i cholesterolem. Sterole połączono z łącznikami o różnej długości łańcucha węglowego, a następnie doczepiono do grupy aminowej mykozaminy wykorzystując reakcję redukcyjnego aminowania. Połączenie *N*-alkilowe pozwoliło na zachowanie zasadowych właściwości atomu azotu, a tym samym całej cząsteczki. Otrzymane produkty zawierające molekułę cholesterolu zdecydowanie gorzej formowały kanały w liposomach niż koniugaty z ergosterolem. Ponadto żaden ze związków nie wykazywał działania przeciwgrzybowego. Tworzenie koniugatu AmB z ergosterolem z wykorzystaniem łącznika dwuwęglowego przedstawiono na **Schemacie 15**.⁸⁸

Podczas przyłączania cząsteczek fosfolipidów do amfoterycyny B wykorzystano identyczną strategię działania, a mianowicie do grupy aminowej przyłączano fosfolipidy o różnej długości łańcuchów acylowych (od 12 do 18 atomów węgla) stosując proces redukcyjnego aminowania. Dowiedziono, iż koniugaty z fosfolipidami C_{12} i C_{14} łatwiej tworzyły kanały w błonie komórkowej niż koniugaty C_{16} i C_{18} .⁸⁹



Schemat 15. Synteza koniugatu amfoterycyny z ergosterolem.

W celu lepszego wyjaśnienia mechanizmu działania makrolidów polienowych Murata et al.90 przeprowadzili syntezę dimerów amfoterycyny B. Do połączenia dwóch cząsteczek AmB wykorzystano łączniki N-acylowe,91 *N*-alkilowe⁹² oraz C-łaczniki.⁹⁰ W wyniku reakcji grupy aminowej cząsteczki AmB z estrem aktywnym kwasu dikarboksylowego utworzono połączenie *N*-acylowe. Jak się spodziewano dimery te nie wykazywały żadnej bioaktywności. Dlatego też łącząc kolejne cząsteczki amfoterycyny B wykorzystano najpierw reakcje redukcyjnego aminowania otrzymując N-aminoalkilowe pochodne, które następnie poddawano reakcji z estrem aktywnym kwasu dikarboksylowego. Pomimo, że analogi te zachowywały charakter zasadowy atomu azotu pochodzącego z mykozaminy były mniej aktywne niż amfoterycyna B.^{91,92} Brak aktywności przeciwgrzybowej N-dimerów był głównym powodem syntezy C-dimerów AmB. Reakcję sprzegania 1,6-heksylodiaminy z grupą karboksylową amfoterycyny B prowadzono w obecność związków służących do tworzenia wiazania amidowego czyli 1-hydroksybenzenotriazolu (HOBt) oraz PyBOP (Schemat 16). Co ciekawe, C-dimery XXXIV zawierające wolną grupę aminowa w cząsteczce mykozaminy posiadały silne właściwości hemolityczne, podczas gdy analogiczny N-acetylo-dimer nie wykazywał żadnej aktywności.⁹⁰



XXXIV

Schemat 16. Synteza dimerów amfoterycyny B z wolną grupą aminową.

Wspomniany wcześniej łącznik piperazynowy został wykorzystany, zarówno do otrzymania koniugatów AmB z biotyną, fluoresceiną, cholesterolem, diazyryną,⁹³ jak i do tworzenia dimeru amfoterycyny B⁹³ czy przyłączenia tryptofanu.⁹⁴ W syntezie tej wykorzystano reakcję redukcyjnego aminowania, w której substratem był dialdehyd powstały w wyniku utleniania pochodnej piperazylowej **XXXV**. Takie postępowanie pozwoliło na uniknięcie etapu otrzymywania alkilowanych pochodnych amfoterycyny B, które są trudniejsze do oczyszczenia. Po otrzymaniu koniugatu AmB-łącznik przeprowadzano reakcję substytucji nukleofilowej, w której atom azotu pochodzący z łącznika atakował centrum elektrofilowe estrów aktywnych dołączanych substratów. Wykorzystanie łącznika piperazynowego okazało się dogodną metodą przyłączania biomolekuł do cząsteczki AmB.⁹³ Na **Schemacie 17** przedstawiono syntezę pochodnej biotynowej amfoterycyny B z wykorzystaniem łącznika piperazynowego.



Schemat 17. Przyłączanie biotyny do cząsteczki amfoterycyny B z wykorzystaniem łącznika piperazynowego.

W ostatnich dziesięcioleciach obserwuje się dynamiczny rozwój chemii supramolekularnej, która znajduje także zastosowanie w medycynie. Funkcjonalizowane nanorurki i parasole molekularne (MU) okazały się dogodnym środkiem w dostarczaniu leków do komórek. Udało się otrzymać nanorurki zawierające, zarówno cząsteczkę AmB, jak i fluoresceiny. Dołączenie cząsteczki barwnika umożliwiło wizualizację wychwytu makrolidu polienowego w komórkach ludzkich Jurkat. Cząsteczka amfoterycyny B przytwierdzona do nanorurki zachowywała swoją aktywność przeciwgrzybową, przy czym nie obserwowano żadnych specyficznych toksycznych właściwości (**Rysunek 6**).⁹⁵



Rysunek 6. Przykład nanorurki funkcjonalizowanej cząsteczką amfoterycyny B i fluoresceiny.

Z kolei Regen *et al.*⁹⁶ przyłączyli cząsteczkę AmB do tzw. parasola molekularnego wykorzystując łącznik disulfidowy⁹⁶ lub ω-aminoacylowy.⁹⁷ Fmoc-amfoterycynę B poddano reakcji z TDBTU tworząc ester aktywny, a następnie kondensacji z 2-(2-pirydyloditio)etyloaminą. Po usunięciu osłon otrzymano pochodną **XXXVI** gotową do sprzęgania z cząsteczką parasola molekularnego zawierającego cztery lub osiem reszt kwasu cholowego (**Schemat 18**).⁹⁶



Schemat 18. Sprzęganie 'parasola molekularnego' z cząsteczką AmB.

4. Synteza de novo półsyntetycznych analogów amfoterycyny B

Pierwszą totalną syntezę AmB oraz jej aglikonu przeprowadzono już pod koniec lat 80-tych ubiegłego wieku. Nicolaou *et al.*^{98–101} zaproponowali i przedstawili analizę retrosyntetyczną pozwalającą na wykorzystanie do syntezy prostych związków o określonej stereochemii, a następnie z sukcesem przeprowadzili reakcje pozwalające na otrzymanie aglikonu amfoterycyny B oraz cząsteczki AmB.^{98–101} W literaturze znaleźć można także otrzymywanie fragmentów cząsteczki makrolidów polienowych.¹⁰²

Wykorzystując połączenie syntezy chemicznej z degradacją naturalnego produktu otrzymano ester metylowy 28-¹⁹F-amfoterycyny B. Podejście to pozwoliło na zmniejszenie liczby etapów syntezy. Fragment zawierający atomy węgla C1-C21 otrzymano poprzez degradację naturalnej cząsteczki AmB. Następnie dołączono do niego zsyntezowany *de novo* fragment zawierający kolejne atomy węgla C22-C37. Otrzymaną pochodną **XXXVII** (**Rysunek 7**) wykorzystano do badań rozszerzających wiedzę o mechanizmie działania makrolidów polienowych.¹⁰³



Rysunek 7. Pochodne amfoterycyny B otrzymane w wyniku syntez typu de novo.

W wyniku wieloetapowej syntezy totalnej otrzymano także ester metylowy 35-deoksy-amfoterycyny B **XXXVIII** (**Rysunek 7**), który przebadano pod kątem aktywności przeciwgrzybowej. Okazało się, że jest on zdecydowanie mniej aktywny niż ester metylowy AmB, co może sugerować, że grupa hydroksylowa przy atomie węgla C35 odgrywa ważną rolę w tworzeniu jonowych kanałów w biwarstwie lipidowej.¹⁰⁴ Burke *et al.*¹⁰⁵ otrzymali pochodną 35-deoksyamfoterycyny B wykorzystując wcześniej zsyntezowane fragmenty boranowe (*ang.* boronate building blocks).^{106,107}

Cel i zakres pracy

Celem pracy było zbadanie możliwości chemicznych modyfikacji amfoterycyny B i nystatyny A_1 w dwóch głównych kierunkach: a) wymiany reszty mykozaminy na inny fragment o podobnym charakterze oraz b) przyłączenia do grupy karboksylowej pochodnych kwasu cholowego i deoksycholowego, tzw. 'parasoli molekularnych'.

Zakres przeprowadzonych badań w ramach kierunku a) obejmował:

- optymalizację warunków reakcji prowadzonych na cząsteczkach makrolidów polienowych, tak aby przebiegały w możliwie łagodnych, bezwodnych warunkach, z powodu labilności amfoterycyny B i nystatyny A₁. Cząsteczki te są nietrwałe w temperaturach powyżej 50 °C oraz w wysokim i niskim p*H*,
- 2. dobór grup ochronnych umożliwiających regioselektywne prowadzenie reakcji,
- 3. otrzymanie chronionych aglikonów amfoterycyny B i nystatyny A1,
- 4. optymalizację warunków reakcji, syntezę chronionych 3-azydo-3-deoksycukrów oraz chronionych pochodnych glukozy,
- przetestowanie możliwości przyłączenia pochodnych 3-azydo-3-deoksycukrów do aglikonów makrolidów polienowych z wykorzystaniem reakcji dehydracyjnej glikozylacji oraz substytucji nukleofilowej.

W ramach badań w kierunku b) opracowano warunki tworzenia koniugatów AmB i NYS z parasolami molekularnymi.

Wyniki i dyskusja

Żaden z dostępnych obecnie na rynku medycznym leków o działaniu przeciwgrzybowym nie jest środkiem idealnym, jednocześnie jest toksyczny dla organizmu pacjenta, dlatego też chemiczne modyfikacje istniejących leków wydają się atrakcyjną strategią w poszukiwaniu leków o podwyższonej, selektywnej toksyczności względem patogennych grzybów. Jak już wspomniałam wcześniej, zarówno amfoterycyna B, jak i nystatyna A₁, należą do tej samej grupy leków przeciwgrzybiczych - makrolidów polienowych. Ze względu na ilość sprzężonych wiązań podwójnych w układzie chromoforowym tych cząsteczek amfoterycyna B jest heptaenem, a nystatyna A₁ tetraenem, co wpływa na ich różne właściwości biologiczne i chemiczne. Obecność wiązania pojedynczego pomiędzy atomami węgla C28 – C29 w strukturze nystatyny A1 sprawia, że jest ona cząsteczką konformacyjnie labilną, o mniejszej zdolności do tworzenia letalnych kanałów w błonach biologicznych niż amfoterycyna B. Wpływa to również na aktywność przeciwgrzybową nystatyny A1, która jest o rząd wielkości mniejsza niż AmB, z drugiej strony NYS A1 wykazuje niższą toksyczność wobec komórek ssaczych, dlatego też nystatyna A1 jest powszechnie stosowanym fungicydem do leczenia infekcji miejscowych. Antybiotyk ten składa się wprawdzie z trzech związków chemicznych: nystatyny A₁, A₂ oraz A₃, jednakże w przewadze występuje nystatyna A₁, a pozostałe składniki stanowią niewielki procent całości. Ponadto nystatyna A1 lepiej rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, co ułatwia jej izolacje z brzeczki pofermentacyjnej. Różnorodność i mnogość grup funkcyjnych w strukturze AmB i NYS A₁ sprawia, iż są one antybiotykami o niewyczerpanym potencjale innowacyjnym, a modyfikacje chemiczne ich struktury mogą przyczynić się do powstania skutecznego leku przeciwgrzybowego.

Zainspirowana badaniami prowadzonymi przez Burke *et al.*^{26,82,83} postanowiłam zbadać możliwość przeprowadzenia chemicznych modyfikacji w cząsteczce nystatyny A₁, a także amfoterycyny B. Ze względu na szeroki wachlarz otrzymanych i przebadanych biologicznie pochodnych o zmienionej grupie aminowej oraz karboksylowej wyżej wymienionych związków postanowiłam zająć się modyfikacjami aglikonu polienowego. Przeprowadzone przeze mnie badania obejmują przyłączanie pochodnych: 3-azydocukrowych, glukozy, 3-fluoroaniliny oraz 3-aminopropanolu do aglikonu makrolidów polienowych. Zaplanowałam w oparciu o literaturę,^{26,82} ciąg reakcji, które przedstawiam na **Schemacie 19** na przykładzie cząsteczki amfoterycyny B. Ponieważ synteza aglikonu jest procesem bardzo skomplikowanym, to możliwość wymiany tylko jednostki aminocukrowej na fragment o dowolnej strukturze jest dobrą alternatywą otrzymywania hemisyntetycznych makrolidów polienowych. Otrzymane w taki sposób, nowe cząsteczki mogłyby charakteryzować się obniżoną toksycznością wobec komórek ssaczych przy wciąż wysokiej aktywności przeciwgrzybowej.



Schemat 19. Zaplanowana chemiczna droga syntezy hemisyntetycznych makrolidów na przykładzie cząsteczki amfoterycyny B.

Równolegle do modyfikacji chemicznych prowadzonych na cząsteczkach nystatyny A₁ i amfoterycyny B prowadziłam prace syntetyczno-badawcze nad przygotowaniem substratów niezbędnych do reakcji substytucji nukleofilowej oraz dehydracyjnej glikozylacji z aglikonem makrolidu polienowego.



Rysunek 8. Struktury komponentów cukrowych i niecukrowych, które planowao wykorzystać w reakcji kondensacji z aglikonem amfoterycyny B.

Wykorzystane przeze mnie komponenty niecukrowe (**Rysunek 8**) były dostępne komercyjnie, jednak należało przeprowadzić je w odpowiednio chronione pochodne. Natomiast pochodne cukrowe, które zaplanowałam przyłączyć do aglikonu amfoterycyny B otrzymałam w wyniku zaprojektowanych syntez z dostępnej komercyjnie glukozy (**Rysunek 8**).

1. Synteza aglikonów makrolidów polienowych

przeprowadzono W naszvm zespole systematyczne badania nad stabilnością chemiczną oraz aktywnością biologiczną cząsteczek AmB oraz nystatyny A_1 w różnych warunkach, tzn. przy niskim i wysokim pH oraz w pokojowej i podwyższonej temperaturze.¹⁰⁸ Wynika z nich, iż czasteczka AmB w temperaturze 37 °C jest stabilna przez 7 dni, zarówno w środowisku kwaśnym, jak i zasadowym. Natomiast wzrost temperatury do 60 °C prowadzi do znaczącej degradacji cząsteczki już po 3 dniach inkubacji. Trwałość nystatyny A1 jest podobna, jednakże środowisko zasadowe powoduje szybsze zmiany w strukturze antybiotyku. Ponadto nystatyna A_1 zaskakująco szybko traciła swoją aktywność przeciwgrzybową w porównaniu z AmB.¹⁰⁸ Odpowiedzialny za taki stan rzeczy może być proces laktonizacji zachodzący w nystatynie A1 i skutkujący powstawaniem izo-nystatyny A₁ opisany przez Szwarc *et al.*¹⁰⁹ Proces ten polega na ataku grupy hydroksylowej przy atomie wegla C36 na grupę karbonylowa na atomie wegla C1 (**Rysunek 9**). Ta wewnatrzczasteczkowa reakcja zachodzi w warunkach, zarówno lekko zasadowych, jak i kwaśnych, co dodatkowo utrudnia przeprowadzenie reakcji chemicznych z udziałem cząsteczki NYS A1. Planujac ścieżke syntetyczna otrzymywania aglikonu makrolidów polienowych należało uwzględnić, z jednej strony niekorzystny wpływ zmian pH oraz podwyższonej temperatury na stabilność antybiotyków/substratów itp., z drugiej - warunki wprowadzania i usuwania potencjalnych grup ochronnych.



Rysunek 9. Proces wewnątrzcząsteczkowej laktonizacji nystatyny A1 do izo-nystatyny A1.

Jak już wcześniej wspomniałam, w makrolidach polienowych występuje wiele grup funkcyjnych, które należało ochronić, uwzgledniajac warunki, w których cząsteczki te nie ulegają degradacji. Dlatego też grupy ochronne wybierałam w taki sposób, aby zarówno ich zakładanie, jak i usuwanie przebiegało w możliwie łagodnych warunkach. Z drugiej strony, ugrupowania z fragmentu aminocukrowego musza być chronione, ale nie zachodzi potrzeba ich selektywnego usuwania, wiec początkowo do ochrony grupy aminowej wybrałam acetyl, który można łatwo wprowadzić. Jednak reakcja makrolidów z chlorkiem acetylu prowadziła do powstawania mieszaniny produktów, z której ciężko było wyizolować pożądany.⁴⁴ Dlatego zdecydowałam się na odczynnik reagujący bardziej selektywnie, a mianowicie N-(9-fluorenylmetoksykarbonyloksy)sukcynimid. Grupa ochronna Fmoc jest stabilna w warunkach lekko zasadowych i kwaśnych, co ułatwiło przeprowadzenie reakcji na kolejnych grupach funkcyjnych bez obaw o przypadkowa deprotekcję. Ponadto reaktywność pochodnej NSU-Fmoc umożliwiła przeprowadzenie reakcji w temperaturze pokojowej bez konieczności ogrzewania mieszaniny reakcyjnej. Kolejna zaleta użycia NSU-Fmoc jako reagenta jest powstawanie jedynie oczekiwanego produktu, który w łatwy sposób izoluje się z mieszaniny poreakcyjnej. Wykorzystując charakter hemiacetalowy grupy hydroksylowej na atomie wegla C13 postanowiłam utworzyć z niej ketal metylowy. Natomiast pozostałe grupy hydroksylowe zaplanowałam osłonić ugrupowaniami trietylosililowymi, których główną zaletą jest selektywne rozszczepianie pod wpływem jonów fluorkowych. Wykorzystanie reaktywnego estru trietylosililowego kwasu trifluorometanosulfonowego jako substratu pozwala na prowadzenie modyfikacji w obniżonej temperaturze. Jedynie W przypadku czasteczki AmB głównym produktem była pochodna z ochronionymi wszystkimi grupami hydroksylowymi, natomiast w przypadku NYS A₁ powstawała mieszanina produktów niemożliwa do rozdzielenia. Diazometan jest popularnym i bardzo reaktywnym odczynnikiem metylującym, przez co wydawał się idealnym środkiem do tworzenia estru, który byłby ochroną grupy karboksylowej. W wyniku reakcji powstawała mieszanina produktów trudna do rozdzielenia oraz znacząco obniżająca wydajność syntezy. Ciekawa alternatywa okazał się bromek allilu, który w łagodnych warunkach zasadowych tworzył z zadowalającą wydajnością ester allilowy chronionej AmB.

Ze względu na problemy związane z trwałością i stabilnością makrolidów polienowych oraz ich pochodnych wszystkie reakcje prowadziłam w atmosferze argonu, używając tylko bezwodnych rozpuszczalników, w temperaturze niższej niż 35 °C. Wszystkie intermediaty były suszone pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie przechowywane w zabezpieczonych przed wilgocią kolbach w temperaturze -5 °C.

55

Prace rozpoczęłam od modyfikacji nystatyny A₁ jako makrolidzie, który jest lekiem. Reakcja NYS z Fmoc-sukcynimidem prowadziła do utworzenia wiązania uretanowego z udziałem grupy aminowej mykozaminy - izolowałam Fmoc-NYS 1. Grupa hydroksylowa na atomie wegla C13, jak już wspominałam, ma odmienny charakter od pozostałych - jest to grupa hemiacetalowa, dlatego wykorzystałam standardowa procedurę tworzenia ketalu poprzez działanie na substrat bezwodnym metanolem w obecności katalitycznych ilości kwasu 10-kamforosulfonowego i otrzymywałam ketal Fmoc-NYS 2. Pozostałe grupy hydroksylowe przeprowadziłam w etery sililowe w reakcji z TESOTf w środowisku zasadowym pochodzącym od 2,6-lutydyny. Trietylosililowe grupy ochronne typu eterowego są atrakcyjne ze względu na trwałość w warunkach, w których prowadzone beda kolejne przemiany chemiczne oraz wysoka labilność wobec jonów fluorkowych, co umożliwi ich selektywne usunięcie. Wadą wybranej metody była możliwość powstawania produktu ubocznego pochodnej 13,14-anhydronystatyny A₁.⁷³ Sililową pochodną **3** izolowałam z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą ciągu ekstrakcji roztworami soli nieorganicznych. Najwiekszy problem sprawiała mi zalecana w takich przypadkach ekstrakcja zanieczyszczeń wodnym roztworem siarczanu miedzi II. Powstająca emulsja była wręcz niemożliwa do rozdzielenia, dlatego też docelowo zrezygnowałam z jej przeprowadzania. Mieszaninę poreakcyjną przemywałam wodnym roztworem wodoroweglanu sodu i woda. W przypadku nystatyny A1 wyizolowany żółty olej składał się z kilku produktów, które jednak zdecydowałam się rozdzielić za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PLC) i ewentualnie zidentyfikować. Po rozwinięciu płytki ilość widocznych produktów ubocznych była jeszcze wieksza niż mogłoby sie wydawać na poczatku. Opisany ciag reakcji przeprowadziłam kilkakrotnie, aby zoptymalizować warunki i wydajności powstających produktów (Schemat 20). W związku z tym, iż wydajność tej reakcji za każdym razem była bardzo niska (rzędu kilku procent), zaniechałam dalszych prób modyfikacji struktury nystatyny A1 i rozpoczęłam prace nad otrzymaniem całkowicie chronionej czasteczki amfoterycyny B ze wzgledu na jej większa stabilność chemiczną, a przede wszystkim brak możliwości zachodzenia wewnątrzcząsteczkowej reakcji transestryfikacji.



Schemat 20.

Analogiczne reakcje do opisanych powyżej dla NYS przeprowadziłam dla amfoterycyny B. Zarówno wprowadzenie ochron grupy aminowej mykozaminy, jak i tworzenie ketalu na atomie wegla C13 przebiegało analogicznie i powstawały produkty ze stosunkowo dobrymi wydajnościami Reakcja sililowania pozostałych grup hydroksylowych, uniemożliwiająca kontynuowanie badań na cząsteczce nystatyny A1, w przypadku amfoterycyny B prowadziła do powstawania dwóch głównych produktów 6ab. Po rozdzieleniu mieszaniny poreakcvinej za pomoca preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej, przeprowadziłam analizę spektroskopową otrzymanych związków. Na podstawie widm 1H NMR stwierdziłam, iż w produkcie ubocznym 6b nie jest obecna pożądana grupa ketalowa. Sugerując się doniesieniami literaturowymi⁷³ uznałam, że powstający produkt uboczny to pochodna 13,14-anhydro AmB. Początkowo reakcję sililowania prowadziłam w heksanie, jednakże zmiana rozpuszczalnika na chlorek metylenu skutkowała lepszą rozpuszczalnością substratów i podnosiła wydajność reakcji. Ekstrakcja mieszaniny poreakcyjnej i oczyszczenie otrzymanego oleju przy użyciu chromatografii PLC pozwoliło na otrzymanie czystego produktu 6a z wydajnościa około 50%.



Schemat 21.

Początkowo grupę karboksylową próbowałam chronić poprzez ester metylowy, który tworzyłam w wyniku działania diazometanem na AmB. Reakcja ta prowadziła do powstania mieszaniny substratu i produktu, a w przypadku dodania większej ilości diazometanu do mieszaniny produktów, które były wynikiem rozkładu amfoterycyny B. Natomiast działając bromkiem allilu na związek **6a** w obecności diizopropyloetyloaminy (DIPEA) otrzymałam ester allilowy chronionej AmB **7** z dobrą wydajnością.

W pełni chronioną cząsteczkę amfoterycyny B **7** wykorzystałam jako substrat w procesie rozszczepiania wiązania glikozydowego z aminocukrem – mykozaminą. W literaturze^{110–112} opisana jest reakcja rozszczepiania wiązań acetalowych i niektórych eterowych poprzez działanie na nie 2,3-dichloro-5,6-

dicyjano-*p*-benzochinonem (DDQ). Proponowany mechanizm tego przekształcenia polega na oderwaniu wodoru przez DDQ oraz utworzeniu karbokationu w cząsteczce zawierającej grupy benzylowe lub allilowe połączone z atomem tlenu. Następnie anion DDQH z karbokationem tworzy reaktywny kompleks, który po hydrolizie ulega oksydatywnemu rozpadowi z utworzeniem grupy karbonylowej (**Schemat 22**).



Schemat 22.

Roztwór pochodnej 7 w tetrahydrofuranie po dodaniu DDQ zmieniał natychmiast barwe na ciemnoczerwona. Po oczyszczeniu mieszaniny reakcyjnej zawierającej kilka produktów najpierw za pomoca ekstrakcji, a następnie PLC otrzymywałam olej barwy czerwonej. Analiza widma ¹H NMR wyizolowanego związku pozwoliła na stwierdzenie, iż jest to pochodna ketonowa 8. Na widmie nie obserwowałam sygnałów pochodzących od protonów grupy Fmoc, a także zmieniły się przesunięcia chemiczne sygnałów protonów znajdujących się w układzie polienowym. Zmiana barwy oraz różnice w widmie ¹H NMR świadczyły o usunięciu jednostki cukrowej z cząsteczki amfoterycyny B. Ponieważ otrzymany keton 8 charakteryzował się małą stabilnością, dlatego natychmiast chroniony pierścień makrolaktonowy poddawałam reakcji redukcji, w której grupę ketonową przekształcałam w ugrupowanie hydroksylowe w sposób standardowy za pomocą borowodorku sodu w mieszaninie metanolu oraz tetrahydrofuranu. Pierwszym objawem zachodzących przemian w strukturze była zmiana barwy z czerwonej na pomarańczowa. Ponadto w pomierzonym widmie ¹H NMR przesunięciu uległy sygnały protonów występujących w fragmencie polienowym. Zsyntezowany aglikon 9 z grupą hydroksylową na atomie węgla C19 wydaje się być dogodnym substratem do tworzenia hemisyntetycznych pochodnych amfoterycyny B ze zmieniona jednostka cukrowa (Schemat 21).

Struktury wszystkich otrzymanych i wyizolowanych związków potwierdziłam na podstawie widm ¹H NMR oraz mas.

2. Próby otrzymywania półsyntetycznych analogów amfoterycyny B

Otrzymany przeze mnie chroniony aglikon amfoterycyny B (**9**) ze względu na obecność grupy hydroksylowej na atomie węgla C19 wydawał się, tak jak wspomniałam wyżej, atrakcyjnym substratem do tworzenia różnego rodzaju połączeń. Właściwości nukleofilowe grupy hydroksylowej umożliwiają formowanie wielu typów wiązań, w tym: acetalowych, eterowych, estrowych czy *O*-glikozydowych. Po analizie literatury^{82,83,84,108} dotyczącej otrzymanych dotychczas pochodnych makrolidów polienowych oraz ich aktywności przeciwgrzybowej postanowiłam zbadać możliwości otrzymywania dwóch typów analogów amfoterycyny B. W pierwszym z nich planowałam wykorzystać tworzenie wiązania eterowego pomiędzy aglikonem amfoterycyny B i substratami niecukrowymi, drugi typ pochodnych miał być oparty na syntezie połączeń *O*-glikozydowych. Ponadto otrzymane analogi miały dzielić się na te, które posiadają w swojej strukturze wolną grupę aminową przyłączoną do atomu węgla C3' oraz niezawierające grupy aminowej w jednostce cukrowej.

2.1. Badania reakcji substytucji nukleofilowej z udziałem aglikonu AmB

Tak jak wspomniałam, grupa hydroksylowa chronionego aglikonu AmB 9 wykazuje właściwości nukleofilowe. Wykorzystując ten fakt postanowiłam przeprowadzić próby reakcji z następującymi pochodnymi: *m*-aminofluorobenzenu **10**, 3-amino-1-propanolu **11** oraz bromkiem 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyloglukopiranozylu **12**. Zarówno w związku **10**, jak i **11** grupa aminowa umiejscowiona jest w pozycji β w stosunku do grupy hydroksylowej 3-amino-1-propanolu lub fluorowej w *m*-aminofluorobenzenie. Atomy węgla połączone z grupą hydroksylową oraz fluorem miały brać udział w tworzeniu wiązania eterowego. Pozycja grupy aminowej w utworzonych koniugatach byłaby analogiczna do tej w mykozaminie połączonej z aglikonem makrolidu.





Aby było możliwe utworzenie wiązania eterowego pomiędzy alkoholem makrolidowym **9** a *m*-aminofluorobenzenem **10** należało jedynie ochronić grupę aminową. Z całej gamy grup ochronnych z kilku przyczyn, o których już niejednokrotnie mówiłam, wybrałam grupę *N*-fluorenylometoksykarbonylową – Fmoc. Z jednej strony można ją łatwo wprowadzić do cząsteczki, z drugiej – ulega ona usunięciu w łagodnych, zasadowych warunkach. W praktyce okazało się, że aromatyczna grupa aminowa charakteryzuje się zbyt słabym charakterem nukleofilowym, aby utworzyć produkt, zarówno w reakcji z chlorkiem kwasowym Fmoc-Cl, jak i estrem aktywnym NSU-Fmoc. Przeprowadziłam więc reakcję *m*-aminofluorobenzenu z diwęglanem di-*tert*-butylu otrzymując Boc chronioną pochodną **13**, która mogła być wykorzystana jako substrat w reakcji tworzenia wiązania eterowego z polienowym alkoholem (**Schemat 23**).



Aby 3-amino-1-propanol 11 selektywnie reagował z aglikonem AmB 9, niezbędne było wprowadzenie ochrony na ugrupowanie aminowe oraz przekształcenie grupy hydroksylowej w jak najlepszą grupę odchodzącą. Boc-3-amino-1-propanol 14 poddałam działaniu bezwodnika kwasu trifluorometanosulfonowego; ku mojemu zaskoczeniu produktem tej reakcji okazał się cykliczny uretan 15. Prawdopodobnie powstająca przejściowo O-triflatowa pochodna ulega natychmiast wewnątrzcząsteczkowej reakcji substytucji nukleofilowej i cyklizuje do związku 15. Natomiast mniej reaktywna pochodna O-mesylowa 16 bez problemu powstawała w reakcji N-Boc-3-amino-1-propanolu 14 z chlorkiem metanosulfonowym (Schemat 24). Struktury otrzymanych związków potwierdziłam na podstawie widm NMR oraz mas.



Schemat 24.

Aby wzmocnić właściwości nukleofilowe grupy hydroksylowej znajdującej się na atomie węgla C19 w aglikonie AmB 9, należało w warunkach zasadowych oderwać od niej proton. Początkowo próbowałam przeprowadzić reakcję intermediatu 9 z pochodną 13 lub 16 wobec równomolowej ilości wodorku sodu. Warunki te okazały się jednak zbyt drastyczne dla labilnej cząsteczki AmB - po dodaniu NaH obserwowałam rozkład użytego substratu 9. Następnie przeprowadziłam analogiczne reakcje substytucji nukleofilowej w delikatnie zasadowym środowisku pochodzącym od węglanu cezu. Tak jak się spodziewałam, nie powodował on rozkładu makrolaktonu amfoterycyny B, jednak w takich warunkach nie zachodziła także reakcja substytucji nukleofilowej ani w układzie alifatycznym, ani aromatycznym. Z mieszaniny poreakcyjnej izolowałam nieprzereagowany substrat 9. Wykorzystując reakcję substytucji nukleofilowei postanowiłam zbadać możliwość przyłaczenia bromku 2,3,4,6-tetra-O-acetyloglukopiranozylu 12 do aglikonu AmB 9. Jest to ogólnie znana w chemii cukrów metoda tworzenia glikozydów.¹¹³⁻¹¹⁵ D-Glukozę przekształciłam w bromek 2,3,4,6-tetra-O-acetyloglukopiranozylu 12 stosując procedure opisana w literaturze.^{116,117} Również wykorzystanie reakcji Koenigs-Knorra do tworzenia wiązania glikozydowego nie prowadziło do otrzymania pożądanych produktów. Struktury wszystkich produktów pośrednich i końcowych poddałam analizie spektralnej za pomocą spektroskopii NMR i spektrometrii mas.

Reasumując, nie jest możliwe utworzenie wiązania eterowego pomiędzy aglikonem AmB **9** a związkami: *N-tert*-butoksykarbonylo-*m*-fluoroaniliną **13**, 3-(*N-tert*-butoksykarbonylo)amino-*O*-mesylo-1-propanolem **16** oraz bromkiem 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-D-glukozopiranozylu **12**, zarówno w warunkach silnie (NaH), jak i słabo zasadowych (Cs₂CO₃).



Schemat 25.

2.2. Badanie reakcji dehydracyjnej glikozylacji

Drugim typem aktywacji jaki przebadałam była reakcja dehydracyjnej glikozylacji, która wydawała się być idealna do łączenia pochodnych cukrowych z aglikonem AmB.⁸³

2.2.1. Synteza hemisyntetycznych amfoterycyn

Jednym ze sposobów tworzenia wiązania glikozydowego jest reakcja zwana dehydracyjną glikozylacją (*ang.* dehydrative glycosylation).¹¹⁸ Przyjmuje się, że polega ona na aktywacji hemiacetalowej grupy hydroksylowej przy pomocy difenylosulfotlenku oraz bezwodnika trifluorometanosulfonowego – tworzy się reaktywny intermediat oksosulfoniowy. Zaktywowana w ten sposób grupa hydroksylowa cukru ulega następnie reakcji substytucji nukleofilowej w środowisku zasadowym pochodzącym od 2-chloropirydyny – powstaje glikozyd (**Schemat 26**).



R - grupa ochronna

Schemat 26. Mechanizm dehydracyjnej glikozylacji.

Wykorzystując przedstawioną powyżej metodę tworzenia wiązania glikozydowego podjęłam próbę przyłączenia pochodnych cukrowych do aglikonu amfoterycyny B 9. Ze względu na wysoka labilność oraz dużą reaktywność intermediatów tworzących się podczas dehydracyjnej glikozylacji prowadziłam reakcję w atmosferze argonu, w obniżonej temperaturze oraz bez dostępu wilgoci. Kluczowa dla prawidłowego przebiegu reakcji jest ścisła kontrola temperatury mieszaniny reakcyjnej, którą należało zmieniać w następujący sposób: -60 °C w momencie wkraplania bezwodnika trifluorometanosulfonowego oraz -30 °C w trakcie dodawania akceptora do donora cukrowego. Ponieważ większość doniesień literaturowych jako akceptor pary elektronowej nukleofila stosuje benzylopochodne cukrów pierwsze próby połaczenia aglikonu AmB 9 z jednostka cukrową przeprowadziłam wykorzystując jako substrat benzyloglukopiranozę 18. Postępując zgodnie z wyżej wymienionymi wytycznymi prowadzenia reakcji glikozylacji przebadałam możliwości przyłączenia następujących pochodnych cukrowych do aglikonu 9: 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-D-glukopiranozy 17, 2,3,4,6-tetra-O-benzylo-D-glukopiranozy 18, 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksylozy 19, 2,4,6-tri-O-trietylosililo-3-azydo-D-allopiranozy 20 oraz 2,4,6-tri-O-trietylosililo-3azydo-D-glukopiranozy 21. Przyłączenie pochodnych cukrowych 18 i 19 do aglikonu AmB zakończyło się sukcesem, jednak wydajność tych reakcji była bardzo niska. W przypadku pochodnej ksylozy niska wydajność reakcji mogła być spowodowana występowaniem pochodnej deoksyrybozy w trzech formach: liniowej oraz dwóch anomerów zamkniętych w pierścień furanozowy, co stwierdziłam spektroskopowo. Ponadto hemisyntetyczna amfoterycyna 22 po pomierzeniu widm magnetycznego rezonansu jadrowego uległa degradacji. Natomiast 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-D-glukopiranoza 17 prawdopodobnie nie tworzyła aktywnego intermediatu pod działaniem difenylosulfotlenku oraz bezwodnika trifluorometanosulfonowego o czym donosi także literatura.¹¹⁸ Po wkropleniu Tf₂O mieszanina czerniała, a substrat ulegał rozkładowi. W przypadku chronionych pochodnych allozy **20** oraz glukozy **21** nie obserwowałam tworzenia pożądanego produktu, a z mieszaniny reakcyjnej izolowałam substraty użyte do reakcji. Wydłużenie czasu reakcji, dodatek sit molekularnych 3Å dla zapewnienia bezwodnych warunków podczas reakcji oraz przeprowadzenie jej na linii schlenka również nie dawało pożądanych produktów, a także nie skutkowało wzrostem wydajności reakcji. Zarówno pochodna allozy **20**, jak i glukozy **21**, charakteryzują się znaczną zawadą przestrzenną wokół anomerycznego atomu węgla i to może być przyczyną zmniejszenia reaktywności w reakcji dehydracyjnej glikozylacji, pomimo że jest to metoda zalecana dla aglikonów o dużych wymaganiach przestrzennych. Struktury wszystkich produktów pośrednich i końcowych potwierdziłam widmami mas i NMR.

Konkludując, warunki dehydracyjnej glikozylacji umożliwiają przyłączenie cząsteczek węglowodanowych do aglikonu amfoterycyny B 9. Jednakże ze względu na zbyt niską wydajność reakcji oraz nietrwałość powstających produktów, deprotekcja otrzymanych hemisyntetycznych amfoterycyn była niemożliwa.



2.3. Interpretacja widm korelacyjnych otrzymanych koniugatów AmB

Widma dwuwymiarowe HSQC, HMBC oraz DOSY pomierzono w Międzyuczelnianym Laboratorium NMR Politechniki Gdańskiej, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku, spektroskopem Unity 500 plus firmy Varian (500 MHz).

W widmach typu HSQC widoczne są sprzężenia ¹H-¹³C atomów bezpośrednio ze soba połaczonych, natomiast w eksperymencie HMBC sygnały ujawniaja połaczenie ¹H-¹³C przez wiele wiazań chemicznych. Najcześciej widoczne są sygnały korelacyjne obrazujące oddziaływanie spinowo-spinowe pomiędzy atomami wodoru i węgla oddalonymi od siebie o dwa, badź trzy wiązania chemiczne. Eksperymenty DOSY pozwalają na rozróżnienie związków nieidentycznych spektroskopowo, na podstawie ich odmiennych współczynników dyfuzji, które zależą od wielkości i kształtu cząsteczek. Dyfuzyjny NMR może być zastosowany do określenia: czy badana próbka jest mieszaniną kilku związków, wielkości cząsteczek i agregatów, stopnia polimeryzacji, wielkości powłoki solwatacyjnej lub innej struktury mikroskopowej. Ze względu na złożona strukture koniugatów makrolidów polienowych, podjeto sie interpretacji fragmentów widm, w których znaleziono sygnały korelacyjne potwierdzające występowanie wiązania glikozydowego w cząsteczkach otrzymanych związków. **Rysunek 11** przedstawia koniugat AmB z czasteczka 2,3,4,6-tetra-*O*-benzylo-Dglukopiranozy 23 z ponumerowanymi atomami wegla w celu łatwiejszej interpretacji wykonanych widm.



Rysunek 11. Koniugat AmB z cząsteczką 2,3,4,6-tetra-O-benzylo-D-glukopiranozy 23

Zmierzone i nałożone na siebie widma HMBC oraz HSQC koniugatu AmB z cząsteczką 2,3,4,6-tetra-*O*-benzylo-D-glukopiranozy **23** widoczne są na **Rysunku 12**. Kolorem zielonym zaznaczone są sygnały widoczne na widmie HMBC. Sygnały widoczne na widmie HSQC mają kolor czerwony – grupy CH oraz CH₃, natomiast grupy CH₂ mają na rysunku kolor niebieski. Sygnał korelacyjny ¹H–¹³C o przesunięciu chemicznym δ_C =83 ppm i δ_H =4.41 ppm odpowiada sprzężeniu protonu H1', który znajduje się na anomerycznym atomie węgla w 2,3,4,6-tetra-*O*-benzylo-D-glukopiranozie, a atomem węgla C19. Sygnał ten jest dowodem na występowanie w cząsteczce wiązania glikozydowego pomiędzy aglikonem amfoterycyny B a jednostką cukru. Na widmie widoczna jest również korelacja w drugim ugrupowaniu ketalowym, pomiędzy protonami w grupie OCH₃ ($\delta_{\rm H}$ =3.07 ppm) a atomem węgla C13 ($\delta_{\rm C}$ =100 ppm).



Rysunek 12. Nałożone widma HSQC oraz HMBC dla koniugatu 23.





Dla otrzymanej pochodnej **23** wykonano również widmo DOSY (**Rysunek 13**). Sygnały widoczne na widmie charakteryzują się podobnym współczynnikiem dyfuzji. Na podstawie rozkładu tych sygnałów można wnioskować, iż w badanej próbce obecny jest jeden związek.

Strukturę koniugatu **22** amfoterycyny B z cząsteczką 2,3,5-trideoksy-3azydo-D-ksylofuranozy (**Rysunek 14**) także potwierdzono za pomocą widm dwuwymiarowych (**Rysunek 15**), jednakże ze względu na mniejszą ilość badanego związku oraz jego labilność w warunkach pomiarów ¹H NMR jakość widm jest gorsza, a intensywność sygnału świadcząca o obecności wiązania glikozydowego niższa niż dla koniugatu **23**. Sygnały widoczne na widmie HSQC mają kolor czerwony – grupy CH oraz CH₃, natomiast grupy CH₂ mają na rysunku kolor niebieski. Sprzężeniu pomiędzy wodorem na anomerycznym atomie węgla C1' a atomem węgla C19 w aglikonie AmB odpowiada sygnał o przesunięciu chemicznym δ_C =99 ppm i δ_H =5.2 ppm.



Rysunek 14. Koniugat AmB z cząsteczką 2,3,5-trideoksy-3-azydo-D-ksylofuranozy.



Rysunek 15. Widmo HSQC dla koniugatu 22.

3. Synteza pochodnych aminocukrowych

Równolegle do syntez prowadzonych na cząsteczkach makrolidów polienowych należało zaplanować ścieżki syntetyczne umożliwiające otrzymanie pochodnych cukrowych, które następnie miały zostać wykorzystane w reakcjach tworzenia koniugatów z aglikonem amfoterycyny B. W tym celu przeprowadziłam wnikliwy przegląd literatury skupiając się na metodach otrzymywana 3-amino-3-deoksycukrów.

3.1. Przegląd literaturowy syntez pochodnych aminocukrów

W literaturze można znaleźć wiele metod opisujących wprowadzanie ugrupowania aminowego do cząsteczki cukru. Strategie te wykorzystują, m. in.: reakcje substytucji nukleofilowej, atak grupy aminowej na pierścień epoksydowy, redukcję oksymów i azydopochodnych, addycję do wiązania podwójnego glukali. Można też otrzymywać aminocukry w syntezie totalnej. Przedstawię te, według mojej opinii, najbardziej uniwersalne, pozwalające na umieszczenie grupy aminowej na dowolnie wybranym atomie węgla w cząsteczce cukru lub te, w których selektywnie wprowadza się funkcję aminową na atom węgla C3.

3.1.1. Synteza aminocukrów z wykorzystaniem reakcji substytucji nukleofilowej (S_N 2).

Substytucja nukleofilowa dwucząsteczkowa jest uniwersalną metodą otrzymywania aminosacharydów. Metoda ta wymaga utworzenia dobrej grupy odchodzącej, która następnie bierze udział w reakcji substytucji nukleofilowej z odczynnikami takimi, jak: amoniak, hydrazyna lub anion azydkowy. Otrzymane pochodne hydrazynowe, azydowe czy amidowe są przekształcane w procesie redukcji w pożądany aminocukier (**Schemat 28**).





Najczęściej stosowanymi w syntezie aminocukrów grupami odchodzącymi są estry sulfonowe, do których należą między innymi grupa tosylowa,¹¹⁹ mesylowa,¹²⁰ trifluorometanosulfonowa^{121,122} czy imidazolosulfonowa.¹²³ Pochodne te otrzymuje się w reakcji grupy hydroksylowej węglowodanów z chlorkami, bądź bezwodnikami kwasów sulfonowych. Wymienione grupy stosuje się w celu uzyskania wyższej wydajności reakcji substytucji nukleofilowej, która biegnie z inwersją konfiguracji. Alternatywną, choć rzadziej stosowaną grupą odchodzącą w omawianych reakcjach substytucji nukleofilowej jest atom halogenu.^{124,125} Natomiast wybór odpowiedniego reagenta o charakterze nukleofilowym bywa problematycznym.

Jednym z chętnie wykorzystywanych reagentów jest ciekły amoniak, który jest nie tylko reaktywnym odczynnikiem nukleofilowym, ale także dobrym rozpuszczalnikiem. Jednakże jego stosowanie może prowadzić do otrzymania niepożądanych produktów, np. pochodnych amin II-rzędowych (**Schemat 29**).¹²⁶



Schemat 29. Otrzymywanie aminocukrów przy użyciu ciekłego amoniaku jako reagenta o charakterze nukleofilowym.

Innymi, często wykorzystywanymi odczynnikami nukleofilowymi, są hydrazyna^{127,128} i anion azydowy.¹¹⁹ Jednak, podobnie jak w przypadku amoniaku, ich zastosowanie w reakcji substytucji nukleofilowej wiąże się z możliwością powstania niepożądanych produktów ubocznych. Ponadto reakcje prowadzone w obecności anionu azydowego wymagają wyższej temperatury i dłuższego czasu, co sprzyja konkurencyjnym reakcjom eliminacji. Najczęściej

wykorzystywanym donorem anionu azydowego jest azydek sodu (**Schemat 30**),¹¹⁹ zdecydowanie rzadziej stosuje się bardziej reaktywny azydek trimetylosililu.¹¹⁷ Pomimo tych niedogodności zastosowanie anionu azydkowego w reakcji substytucji nukleofilowej pozwoliło na otrzymanie wielu pochodnych azydowych, będących prekursorami aminocukrów.^{129–135}



Schemat 30. Otrzymywanie 6-amino-6-deoksy-1,2-*O*-izopropylideno-α-D-allofuranozy z wykorzystaniem azydku sodu w reakcji S_N2.¹¹⁹

3.1.2. Synteza aminocukrów z wykorzystaniem pochodnych epoksydowych

Kolejna ścieżka syntezy aminocukrów wykorzystuje atak nukleofilowej cząsteczki amoniaku na pochodną cukru zawierającą pierścień epoksydowy. Strategia ta pozwala na pominiecie etapu otrzymywania intermediatu zawierającego dobra grupe odchodząca. Niestety metoda ta ma także poważna wadę, podczas reakcji atak nukleofila może nastąpić na dwa różne atomy wegla wchodzące w skład pierścienia epoksydowego, w wyniku czego otrzymuje się mieszaninę produktów. Stosunek ilości otrzymanych produktów zależy od geometrii użytego do reakcji substratu. Na przykład w reakcji 4,6-dimetylo-2,3-anhydro-β-O-metylomannozy (XLVIII) z amoniakiem powstają: 3-amino-3deoksy-\beta-altroza (XLIX) oraz 2-amino-2-deoksy-\beta-glukoza (L) w stosunku 9:1 (Schemat 31).^{136,137} Pomimo wad metodę tę wykorzystano do otrzymania wielu 4-amino-4,6-dideoksy-D-mannozy, pochodnych aminocukrowych, np. 3,6-diamino-3,6-dideoksy-L-talozy czy 2-amino-2-deoksy-D-idozy.¹³⁷⁻¹⁴⁶


Schemat 31. Synteza aminocukrów z wykorzystaniem ataku nukleofilowego amoniaku na pierścień epoksydowy.

3.1.3. Addycja grup zawierających atom azotu do wiązania podwójnego glukali

Substratami wykorzystywanymi w tej reakcji są cząsteczki chronionych glukali, czyli pochodnych cukrowych zawierających wewnątrzcząsteczkowe wiazanie podwójne.^{147–150} W literaturze znaleźć można wiele ścieżek syntetycznych opisujących wprowadzenie grupy aminowej do szkieletu cukru przy użyciu glukali. Reakcje te prowadzą ostatecznie do utworzenia wiązania C-NH₂ oraz C-OH na dwóch sąsiadnich atomach węgla, wcześniej tworzących wiązanie podwójne.

3.1.3.1. Addycja jonu azydkowego do glukali

Kluczowym etapem tej ścieżki syntetycznej jest addycja jonu azydkowego do wiązania podwójnego *O*-chronionej pochodnej LII, co pozwala na uzyskanie w łatwy sposób 2-amino-2-deoksypochodnych cukrowych. Dobrym przykładem zastosowania tej metody syntezy może być otrzymywanie L-akozaminy przedstawione na Schemacie 32. Ogrzewanie L-ramnalu LI w obecności wody prowadzi do otrzymania pochodnej 2-heksenopiranozy LII, która pod działaniem azydku sodu zostaje przekształcona w azydopochodną LIII. Następnie poddając ją kilku prostym reakcjom otrzymuje się pochodną *O*-metyloakozaminy LIV.^{151–153} Wykorzystując w reakcji jako substrat nitropochodną glukalu można otrzymać diamino-dideoksycukier.¹⁵⁴



Schemat 32. Synteza glikozydu metylowego akozaminy w wyniku reakcji addycji jonu azydkowego do wiązania podwójnego glukalu.

3.1.3.2. Fotoindukowane tworzenie pierścienia azyrydynowego w glukalach

Kolejna metoda otrzymywania aminodideoksycukrów wykorzystuje proces fotoindukcji – w wyniku której powstaje intermediat zawierający w swojej strukturze pierścień azyrydynowy. Dobrą ilustracją tej metody jest synteza L-daunozaminy (**Schemat 33**), w której substratem był L-*treo*-2-heksenopiranozyd **LVII**. Kluczowym etapem syntezy było naświetlanie intermediatu **LVIII**, z którego otrzymano pochodną z pierścieniem azyrydynowym **LIX**. Regioselektywne otwieranie pierścienia azyrydynowego pod wpływem wodoru w obecności katalizatora Pd/C oraz następcza hydroliza w warunkach zasadowych prowadziły do otrzymania L-daunozaminy **LX**.¹⁵⁵



Schemat 33. Synteza L-daunozaminy.

3.1.3.3. Asymetryczna aminohydroksylacja glukali

Grupę aminową można również wprowadzić do glukali poprzez asymetryczną aminohydroksylację katalizowaną związkami osmu. Oksazolidynowy pierścień, powstający w jednym z etapów, ulega hydrolizie w zasadowym środowisku wodorotlenku litu, co pozwala na uzyskanie aminocukrów. Syntezę pochodnej 3-amino-3-deoksy-α-D-talopiranozydu metylowego wykorzystującą powyższą metodę przedstawiono na **Schemacie 34**.¹⁵⁶ Alternatywnym katalizatorem używanym w reakcji asymetrycznej aminohydroksylacji są związki rodu (II).^{157–159}



Schemat 34. Otrzymywanie pochodnej 3-amino-3-deoksy-α-D-talopiranozydu w reakcji asymetrycznej aminohydroksylacji katalizowanej pochodnymi osmu.

3.1.4. Addycja jonu cyjankowego do grupy karbonylowej cukru

Reakcja addycji jonu cyjankowego do ugrupowania karbonylowego skutkuje wprowadzeniem do szkieletu cząsteczki cukrowej jednocześnie prekursorów dwóch grup: aminowej i metylowej. W wyniku addycji jonu cyjankowego i przekształceniu grupy hydroksylowej w mezylopochodną otrzymano nitryl **LXVIII**, który następnie poddano reakcji redukcji za pomocą wodorku litowo-glinowego. W związku **LXIX** przebiega wewnątrzcząsteczkowa reakcja substytucji nukleofilowej i grupa aminometylenowa zamyka trójczłonowy pierścień z utworzeniem pochodnej spiro-azyrydynowej **LXX**. Związek ten jest redukowany w obecności niklu Raneya do pochodnej aminocukrowej **LXXI** (**Schemat 35**).



Schemat 35. Idea wprowadzania grup aminowej i metylowej do cząsteczki węglowodanu z wykorzystaniem reakcji addycji nukleofilowej jonu cyjankowego.

3.1.5. Synteza totalna aminocukrów

Jak już wspomniano wcześniej, wiele aminocukrów jest komponentami antybiotyków, a znaczna ich część to 3-amino-3-deoksyheksozy lub 3-amino-3,6dideoksyheksozy, które można otrzymać w wyniku prostych syntez opisanych powyżej. Natomiast, aby otrzymać aminocukry zawierające w swojej strukturze drugorzędową grupę deoksy, takie jak np. daunozamina czy ristozoamina, wykorzystuje się syntezę *de novo*. Dotychczas opublikowano wiele przykładów totalnych syntez aminocukrów, wychodząc z prostych cząsteczek niecukrowych.¹⁶⁰⁻¹⁶¹ Poniżej przedstawiono tylko niektóre z nich subiektywnie wybrane przez autora.

3.1.5.1. Synteza de novo aminocukrów z alkoholi

Alkohole zawierające w swojej strukturze wiązania wielokrotne sa wykorzystywane jako substraty w syntezie amino-trideoksycukrów. Stereoselektywna svnteza pochodnych N-trichloacetylo-L-daunozaminy, L-ristozaminy oraz L-wankozaminy z nienasyconych alkoholi została zaproponowana i opisana przez Hauser *et al.*¹⁶⁰ Otrzymywanie daunozaminy LXXVIa z alkoholu sorbylowego LXXII przedstawiono na Schemacie 36. W pierwszym etapie syntezy do łańcucha weglowego alkoholu LXXII w warunkach reakcji Overmana wprowadzono grupę aminową otrzymując pochodną LXXIII. Następnie stosując przegrupowanie Pummerera uzyskano intermediat LXXIV, a jego hydroliza w obecności chlorku miedzi II pozwoliła na utworzenie ugrupowania aldehydowego w związku LXXV. Przeprowadzenie hydroksylacji wiązania podwójnego w obecności katalitycznych ilości tetratlenku osmu oraz TMNO doprowadziło do powstania mieszaniny dwóch produktów: pochodnej daunozaminy LXXVIa oraz jej ksylo izomeru LXXVIb w stosunku 6:4.¹⁶⁰



AIBN - 2,2'-azobis(2-metylopropionitryl)

Schemat 36. Synteza pochodnej daunozaminy z dienolu.

Schemat 37 przedstawia syntezę D-kanozaminy z komercyjnie dostępnego alkoholu – mannitolu. Substrat **LXXVII**, przekształcono w chroniony aldehyd glicerynowy **LXXIX**, który poddano krzyżowej kondensacji aldolowej z aminoketonem **LXXX** w obecności katalitycznych ilości Sn(OTf)₂. Następnie przeprowadzono stereoselektywną redukcję ugrupowania ketonowego działając kompleksem boran:siarczek dimetylu na aldol **LXXXI**. Zastosowanie azotanu cerowo-amonowego [CAN, (NH₄)₂Ce(NO₃)₆] pozwoliło na uwolnienie dienu z kompleksu z żelazem. Ozonoliza z następczą redukcją grupy aldehydowej doprowadziły w konsekwencji do powstania kanozaminy **LXXXIV**.¹⁶²



NEP - *N*-etylopiperydyna M - Fe(CO)₃

Schemat 37. Totalna synteza D-kanozaminy.

3.1.5.2. Synteza *de novo* aminocukrów z wykorzystaniem kwasów, estrów lub laktonów jako substratów

Zwiazki tytułowe wykorzystywane sa przede wszystkim w syntezie aminodideoksy – badź aminotrideoksycukrów. Bagal et al.¹⁶³ opisali siedmioetapową syntezę L-akozaminy XC, w której substratem był kwas sorbinowy (Schemat 38). Sorbinian metylu poddano reakcji addvcii z R-N-benzylo-N-(α -metylobenzylo)amidkiem litu otrzymujac aminoester LXXXVI. Utlenienie wiazania podwójnego za pomoca nadkwasu trifluorooctowego prowadziło do powstania nietrwałego epoksydu LXXXVII, który pod działaniem kwasu tetrafluoroborowego natychmiast przekształcał się w lakton LXXXVIII. W wyniku sekwencji czterech kolejnych reakcji otrzymano pochodna L-akozaminy XC.¹⁶³



Schemat 38. Synteza de novo L-akozaminy z kwasu sorbinowego.

W kolejnej syntezie *N*-benzoilo-L-akozaminy wykorzystano reakcję addycji (*S*)-mleczanu etylu (**XCI**) do eteru etylowowinylowego. Reakcja redukcji grupy etoksykarbonylowej, a następnie utlenienia doprowadziły do otrzymania aldehydu **XCII**. Związek ten poddano reakcji sprzęgania z 2-hydroksy-2-cyjanopropanem otrzymując acetal **XCIV**, który w wyniku reakcji addycji związku magnezoorganicznego tworzył pochodną **XCV**. Redukcja wiązania podwójnego, a następnie hydroliza kwasowa pochodnej **XCVI** skutkowały powstaniem laktonu **XCVII**, który w ostatnim etapie został poddany reakcji redukcji wodorkiem di-*tert*-butyloglinu, w której produktem była *N*-benzoilo-L-akozamina **XCVIII** (**Schemat 39**).¹⁶⁴





Schemat 40 przedstawia totalną syntezę L-daunozaminy zaproponowaną przez Jurczaka *et al.*¹⁶¹ Za substrat należy uznać β -aminolakton XCIX, który otrzymuje się w prosty sposób z kwasu L-asparaginowego. Stereoselektywna addycja chlorku winylomagnezowego do aldehydu CI z następczym utlenianiem wiązania podwójnego prowadziła do epoksydopochodnej CII o określonej konfiguracji. Szereg następujących po sobie reakcji, polegających na redukcji, protekcji oraz deprotekcji grup funkcyjnych doprowadził do otrzymania pochodnej L-daunozaminy CIV.¹⁶¹



Schemat 40. Totalna synteza L-daunozaminy z pochodnej β-aminolaktonu.

3.2. Synteza pochodnych cukrowych

Przedstawiony powyżej subiektywny przegląd literatury pozwolił mi na zaprojektowanie ścieżki syntetycznej pochodnych aminocukrów, która spełniałaby następujące kryteria: była możliwie jak najkrótsza, obejmowała stereoselektywne, wydajne reakcje chemiczne, a także wykorzystywała dostępne komercyjnie, tanie substraty. Przeprowadziłam próby przyłączania do aglikonu makrolidowego 9 następujących azydocukrów, które są prekursorami aminowęglowodanów: 3-azydo-2,3,5-trideoksyksylozy 19, 2,4,6-tri-*O*-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksyallozy 20 oraz 2,4,6-tri-*O*-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksyallozy 21 (Rysunek 11).



3.2.1. Synteza 3-azydo-3-deoksycukrów

Jak już wspomniałam wyżej, dogodnymi prekursorami do wprowadzenia ugrupowania aminowego do cząsteczek węglowodanów są pochodne: epoksydowe, oksymowe, hydrazydowe oraz azydowe. Węglowodany zawierające w swojej strukturze grupę azydową, w wyniku redukcji, mogą w łatwy sposób zostać przekształcone w aminocukier. Otrzymuje się je poprzez działanie na azydopochodne wodorem w obecności katalizatora palladowego lub trimetylofosfiną w łagodnych warunkach. Przede wszystkim ta właśnie przesłanka zadecydowała o wyborze w/w związków w moich pracach syntetycznych.

3.2.1.1. Synteza 3-azydo-2,3,5-trideoksyksylozy

Dotychczas nie opisano w literaturze otrzymywania 3-azydo-2,3,5trideoksyksylozy z 2-deoksy-D-rybozy. Cząsteczka 2-deoksy-D-rybozy charakteryzuje się małą liczbą podstawników w porównaniu z innymi cukrami, więc wydawało się, że modyfikacja jej struktury powinna być stosunkowo prosta w wykonaniu. Aby przekształcić ją w 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksylozę, prekursora odpowiedniego aminocukru i substratu w reakcji glikozydowania aglikonem makrolidu polienowego, przeprowadziłam ciąg reakcji przedstawionych na Schemacie 41. Wykorzystując opisaną w literaturze procedure¹⁶⁵ wprowadziłam grupę metylową na anomeryczny atom węgla C1 działając na cukier bezwodnym metanolem i katalityczną ilością chlorku acetylu. W wyniku reakcji otrzymałam 2-deoksy-D-rybozyd metylowy (27). Soll et al.¹⁶⁶ zaproponowali synteze 2,5-dideoksy-D-rybozy, zaadoptowałam niektóre z przejść, aby otrzymać 2,5-dideoksy-D-rybozyd metylowy 29. Substratem w moim przypadku był 2-deoksy-D-rybozyd metylowy, w którym stosując reakcję Appel'a wymieniłam grupę hydroksylową na atomie węgla C5 na atom jodu otrzymujac jodopochodna 28. Następnie prowadząc reakcję dehalogencji związku 28 w atmosferze wodoru, przy użyciu katalitycznych ilości wodorotlenku palladu otrzymałam 2,5-dideoksy-D-rybozyd metylowy 29. Uzyskana w ten sposób pochodna rybozy 29 charakteryzowała sie obecnościa tylko jednej grupy hydroksylowej na atomie wegla C3, taki stan umożliwił mi regioselektywne wprowadzenie grupy azydowej do cząsteczki cukru. W kolejnym etapie należało intermediat 29 przekształcić w azydopochodną 31. Pomimo iż wprowadzenie ugrupowania azydowego do pierścienia furanowego jest opisane w literaturze,¹⁶⁷ to proces ten wymagał opracowania przeze mnie całkowicie odmiennych warunków jego prowadzenia. Zdecydowałam się na produkt pośredni w postaci pochodnej triflatowej 30, która otrzymałam przez modyfikację standardowej metodyki wprowadzania takiego ugrupowania na grupę hydroksylową. Nietrwałą trifluorometanosulfonowa pochodna 2,5-dideoksy-D-rybozy 30, natychmiast po izolacji używałam jako substratu w reakcji substytucji nukleofilowej z azydkiem sodu. Po deprotekcji intermediatu 31 otrzymałam 3-azydo-2,3,5trideoksyksylozę 19 gotową do przyłączenia do aglikonu makrolidu polienowego 9. Struktury otrzymanych zwiazków potwierdziłam widmami mas oraz protonowego magnetycznego rezonansu jadrowego.



Schemat 41. Synteza 3-azydo-2,3,5-trideksy-D-ksylozy.

3.2.1.2. Synteza 3-azydo-3-deoksyheksoz

Podobnie jak w przypadku pentoz, pochodne 3-azydo-3-deoksyheksoz (Schemat 42), aby mogły posłużyć jako substraty w reakcji dehydracyjnej glikozylacji, tzn. w przyłączaniu ich do aglikonu AmB (9), musiały spełniać kilka wymagań. Przede wszystkim grupy hydroksylowe w otrzymanych cząsteczkach cukrów należało tak zabezpieczyć, aby nie brały udziału w reakcji z aglikonem anomeryczna grupa hydroksylowa, AmB. Jedynie powinna pozostać niechroniona, ponieważ tylko w takim przypadku możliwe jest selektywne połączenie jednostki cukrowej z aglikonem AmB. Ponadto zastosowane grupy ochronne powinny w łagodnych warunkach ulegać selektywnej deprotekcji, aby w możliwie łatwy sposób usunąć je z otrzymanej cząsteczki hemisyntetycznej amfoterycvny. Dlatego też w docelowych pochodnych 3-azydo-3-deoksyheksoz zdecydowałam się na użycie grup sililowych, które wykorzystałam również podczas syntezy aglikonu AmB 9, aby można było usunąć jak największą liczbę ochron w jednym procesie. Zaletą zastosowania akurat takich grup ochronnych była możliwość uwalniania wszystkich grup hydroksylowych o charakterze alkoholowym przy pomocy jonów fluorkowych. Jednakże wadą osłon sililowych jest ich labilność w warunkach kwasowych, co znacznie ograniczyło możliwość wyboru grupy ochronnej anomerycznego atomu węgla C1 w trakcie syntezy substratów cukrowych. Wiekszość acetali takich jak np. metylowy czy benzylowy ulega rozszczepieniu właśnie w środowisku kwaśnym, dlatego też wybrana przeze mnie grupa ochronna musiała zostać selektywnie usunięta w innych warunkach. W literaturze¹⁶⁸ opisano rozszczepianie glikozydów allilowych kompleksem metalu, najczęściej rutenu i trifenylofosfiny. Postanowiłam sprawdzić możliwości selektywnego usuwania grupy allilowej z odpowiednich glikozydów heksoz wykorzystując do tego celu kompleksy palladu. Przetestowałam różne kombinacje rozpuszczalników, dodatków oraz katalizatorów używanych do usuwania grupy allilowej z eterów, m. in.: tetrakis(trifenylofosfino)pallad (0), dichlorek bis(trifenylofosfino)palladu-trifenylofosfina oraz chlorek palladu-MeOH. Wszystkie zastosowane przeze mnie odczynniki i warunki reakcji zostały opisane w kolejnych podrozdziałach.



Schemat 42. Synteza pochodnych: 3-azydo-3-deoksy-D-allozy 20 oraz 3-azydo-3-deoksy-D-glukozy 21.

Wspólnym substratem, który wykorzystałam do syntezy chronionych: 3-azydo-3-deoksy-D-allozy **20** oraz 3-azydo-3-deoksy-D-glukozy **21**, była D-glukoza **32**. W reakcji glukozy z acetonem w środowisku kwaśnym otrzymałam glukofuranozę **33**, w której grupy hydroksylowe znajdujące się na atomach węgla C1, C2 oraz C5, C6 są zablokowane osłonami izopropylidenowymi typu acetalowego. Tak ochroniona pochodna **33** posiada tylko jedną wolną, reaktywną grupę hydroksylową na atomie węgla C3. Dzięki temu zabiegowi mogłam selektywnie przeprowadzać kolejne reakcje. W oparciu o literaturę^{169,170} przeprowadziłam izomeryzację na atomie węgla C3, która polegała na utlenieniu tej grupy hydroksylowej za pomocą PDC, a następnie stereoselektywnej, z uwagi na ograniczenia przestrzenne, redukcji grupy karbonylowej do hydroksylowej przy użyciu borowodorku sodu. (**Schemat 42a**)



Kluczowym etapem W syntezie 3-azydo-3-deoksyheksoz było wprowadzenie do cząsteczki cukru grupy azydowej. Na podstawie literatury^{170,171} zdecydowałam się wykorzystać reakcję substytucji nukleofilowej pomiędzy azydkiem sodu a aktywowaną pochodną cukru. W tym celu grupę hydroksylową na atomie wegla C3 w pochodnych 33 oraz 41 musiałam przekształcić w dobra grupę odchodzącą. Przebadałam, zarówno pochodną mesylową, jak i tosylową, które otrzymałam w standardowych warunkach.¹⁷² Jednakże obydwie pochodne okazały się za mało reaktywne i nie wchodziły w reakcję z azydkiem sodu. Natomiast zdecvdowanie bardziej reaktywne okazały sie. zgodnie z przewidywaniami, pochodne triflatowe 34 i 42, które otrzymałam działałając bezwodnikiem kwasu trifluorometanosulfonowego na pochodną 33 oraz 41 Opracowałam warunki przekształcenia pochodnych 34 i 42 w ich odpowiedniki azydowe 3-azydo-3-deoksy-D-heksozy 35a i 43 (Schemat 42b).



Schemat 42b.

danvch literaturowvch^{170,171} substytucia nukleofilowa Pomimo O-tosylowych pochodnych cukrów z użyciem azydku sodu wymagała optymalizacji warunków reakcji. Ostatecznie 1,2;5,6-O-diizopropylideno-3azydo-3-deoksy- α -D-allofuranoze 35a otrzymałam prowadzac reakcję *O*-trifluorometanosulfonowej pochodnej 34 azydkiem sodu Z w *N*,*N*-dimetyloformamidzie w temperaturze 90 °C. Następnie stosując analogiczne warunki próbowałam otrzymać pochodną 3-azydo-3-deoksyglukozy 43, niestety reakcja ta nie prowadziła do pożądanego produktu. Dopiero zamiana rozpuszczalnika na tetrahydrofuran, a tym samym obniżenie temperatury reakcji do 66 °C pozwoliło na otrzymanie pochodnej 43 w wyniku działania azydkiem sodu na związek 42. Konkurencyjną do reakcji substytucji nukleofilowej jest eliminacja, której jak wiadomo, sprzyja wyższa temperatura prowadzenia procesu, dlatego też oprócz pożądanej pochodnej 35a izolowałam produkt uboczny – związek 35b powstający w wyniku eliminacji (Schemat 42c). Natomiast w przypadku syntezy związku 43 obserwowałam powstawanie tylko niewielkich ilości produktu eliminacji.



Schemat 42c.

Aby cząsteczki azydocukrów mogły być substratami w reakcji dehydracyjnej glikozylacji z aglikonem AmB **9** musiałam wymienić w nich ochrony grup hydroksylowych poza anomeryczną, która powinna pozostać wolna. Zmiana ugrupowań izopropylidenowych na sililowe wymagała chwilowej ochrony grupy hydroksylowej znajdującej się na atomie węgla C1. Początkowo postanowiłam zablokować ją przy pomocy glikozydu allilowego, który następnie mogłabym selektywnie usunąć w obecności grup *O*-trietylosililowych znajdujących się na atomach węgla C2, C4 oraz C6. Po usunięciu grup izopropylidenowych rozcieńczonym kwasem solnym otrzymywałam glikozyd allilowy **36** w wyniku działania na cukier alkoholem allilowym wobec H_2SO_4 . Następnie związek **36** poddawałam reakcji z trifluorometanosulfonianem trietylosililu w obecności pirydyny otrzymując całkowicie chronioną pochodną 3-azydo-3-deoksy-D-allozy **37** (**Schemat 42d**).



Ostatnim etapem, dzielącym mnie od pożądanego produktu 2,4,6-tri-*O*-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozy (**20**) było selektywne usunięcie grupy allilowej z glikozydu **37**. Tak jak już wcześniej wspomniałam, sprawdziłam kilka układów stosowanych do usuwania grupy allilowej z odpowiednich eterów. Wszystkie reakcje prowadziłam w atmosferze argonu i temperaturze pokojowej stosując katalizatory i rozpuszczalniki widoczne na **Schemacie 42e**.

Zastosowanie katalizatorów palladowych w metanolu prowadziło do usuwania funkcji allilowej oraz osłon trietylosililowych. Prawdopodobną przyczyna takiego stanu rzeczy mogło być tworzenie się *in-situ* katalitycznych ilości kwasu solnego. Postanowiłam więc wymienić grupy trietylosililowe środowisku na bardziej trwałe w kwaśnym, grupy ochronne tert-butylodimetylosililowe. Pomimo większej stabilności grup TBS nie udało mi się otrzymać pożądanych produktów. Natomiast w przypadku zastosowania środowiska zasadowego lub N-bromosukcynimidu w wodnym acetonitrylu nie obserwowałam żadnej reakcji.



W literaturze¹⁷³ opisane sa glikozydy 4-pentenylowe niektórych heksoz. charakteryzujące się dużą labilnością w obecności NBS w środowisku wilgotnego acetonitrylu. Założyłam, że warunki niezbędne do rozszczepienia takiego glikozydu nie powinny wpłynać negatywnie na obecne w strukturze cukru ugrupowania trietylosililowe. Glikozydy 4-pentenylowe azydoheksoz otrzymałam działając na odpowiednie cukry 4-penten-1-olem w obecności kwasu 10-kamforosulfonowego. Analogicznie do poprzednio stosowanego postępowania pozostałe grupy hydroksylowe ochroniłam osłonami trietylosililowymi. Nastepnie działając na ochronionv glikozvd 39 N-bromosukcynimidem otrzymałam 3-azydo-3-deoksy-D-allozę 20 (Schemat warunków 42f). Po opracowaniu reakcji na pochodnej allozy w analogiczny sposób otrzymałam 2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-glukoze (21). Pochodne 20 i 21 były dogodnymi substratami, które mogłam wykorzystać w reakcji dehydracyjnej glikozylacji z aglikonem makrolidu polienowego 9. Struktury otrzymanych związków potwierdziłam spektrometrią mas oraz spektroskopią magnetycznego rezonansu jądrowego.





3.2.2. Synteza pochodnych glukozy

Wydawało się, że łatwo dostępnymi substratami do opracowania warunków reakcji glikozydowania aglikonem AmB **9** będą pochodne glukozy: 2,4,5,6-tetra-*O*-acetylo-D-glukopiranoza **46**, 2,4,5,6-tetra-*O*-benzylo-D-glukopiranoza **47** oraz 3,4,6-tri-*O*-trietylosililo-2-deoksy-D-glukozy **48** (**Rysunek 12**). Wszystkie te związki otrzymałam w wyniku krótkich syntez składających się z prostych reakcji opisanych w literaturze.^{116,117,174–178} Miały one służyć do optymalizacji warunków reakcji glikozydowania alkoholu **9** oraz usuwania

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

grup ochronnych w powstających glikozydach. Z drugiej strony, takie analogi AmB byłyby przydatne do sprawdzenia czy faktycznie grupa aminowa znajdująca się w jednostce cukrowej ma istotny wpływ na aktywność przeciwgrzybową makrolidów.



Podsumowując, zaprojektowane ścieżki syntetyczne pozwoliły na otrzymanie pochodnych 3-azydo-3-deoksycukrów. Reakcja substytucji nukleofilowej jonu azydkowego okazała się efektywną metodą w przypadku użycia grupy trifluorometanosulfonowej jako grupy odchodzącej. Najwięcej problemów napotkałam podczas modyfikacji cząsteczki 2-deoksyrybozy, jednakże i w tym przypadku udało się uzyskać pożądany produkt – 3-azydo-2,3,5trideoksy-D-ksylozę. Wszystkie otrzymane, chronione pochodne zostały przetestowane w reakcji dehydracyjnej glikozylacji z aglikonem AmB **9**.

3.2.3. Synteza i właściwości 2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukozaminy oraz analogów 6-sulfo-D-glukitoli.

Enzym amidotransferaza L-glutamina: D-fruktozo-6-fosforan, zwany także syntazą GlcN-6-P (GFAT), odpowiedzialny jest za katalizowanie pierwszego etapu biosyntezy urydynodifosforanu-*N*-acetylo-D-glukozaminy (UDP-Glc-NAc), który to związek jest prekursorem metabolicznym do produkcji chityny w komórkach grzybowych. Poszukiwanie inhibitorów dla tego enzymu jest atrakcyjną strategią w opracowaniu nowych potencjalnych leków przeciwgrzybiczych. Znanymi do tej pory inhibitorami GFAT są m.in. 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-P (ADGP) oraz 2-amino-2-deoksy-D-mannitolo-6-P (ADMP).¹⁷⁹ Pochodne ADGP o charakterze bardziej hydrofobowym wykazują interesującą aktywność przeciwgrzybiczą.¹⁸⁰ W założeniach projektu badawczego stanowiącego podstawę mojej rozprawy doktorskiej, 2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukozamina miała być jedną z pochodnych cukrowych, które byłyby przyłączane do aglikonu Amfoterycyny B. Opracowałam metodę syntezy tego związku, a ponadto jego analogów oraz aminoglukitoli będących analogami ADGP jako potencjalnych inhibitorów GFAT.

Wykorzystując jako substrat *N*-acetylo-D-glukozaminę **47** otrzymałam następujące pochodne: 2-amino-2,6-dideoksy-D-6-sulfoglukopiranozę **51a**, *N*-acetylo-2-amino-2,6-dideoksy-D-6-sulfoglukopiranozę **52a** oraz estry metylowe obydwu pochodnych (**51b**, **52b**), a także kwasy: 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-sulfonowy **53** i *N*-acetylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-sulfonowy **54** (**Schemat 43**).



Schemat 41. Synteza pochodnych kwasu sulfonowego.

Tak jak wyżej wspomniałam, do syntezy użyłam komercyjnie dostępną *N*-acetylo-D-glukozamine **47**, w której selektywnie osłoniłam grupe hydroksylowa na anomerycznym atomie węgla C1. Utworzyłam acetal 48 działając na związek 47 bezwodnym alkoholem benzylowym w obecności katalitycznych ilość chlorku tionylu. Analogiczna reakcja, z wykorzystaniem alkoholu opisana benzvlowego wysyconego gazowym HCl została w literaturze.¹⁸¹ Stosując reakcję Appela działałam tetrabromkiem węgla trifenylofosfina 2-acetamido-D-2obecności pirydyny na i W deoksyglukopiranozyd benzylu 48. Reakcja ta przebiegała regioselektywnie i uzyskiwałam produkt **49** z przyłaczonym atomem bromu do atomu wegla C6. W pierwszym etapie reakcji Appela trifenylofosfina reagując z odczynnikiem elektrofilowym - tetrabromkiem węgla tworzy sól fosfoniową. Następnie

po deprotonowaniu alkoholu tworzy się alkoksylan i powstaje produkt pośredni, który przekształca się w bromek alkilowy zgodnie z mechanizmem reakcji S_N2. Oprócz pożądanego produktu reakcji, powstaje także produkt uboczny – tlenek trifenylofosfiny, bardzo trudny do usuniecia. W przeciwieństwie do zalecanej w literaturze¹⁸² procedury zaproponowałam inny tok postępowania w celu usunięcia tlenku trifenylofosfiny. Ponieważ produkt uboczny łatwo rozpuszczał się w toluenie w przeciwieństwie do produktu 49, dlatego zastosowałam procedure ługowania surowej mieszaniny poreakcyjnej wspomnianym rozpuszczalnikiem. Następnie wstępnie oczyszczony produkt dodatkowo dzieliłam przy użyciu chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent chloroform. Taki rozpuszczalnik pozwolił na powolną elucję czystego zwiazku 49. Wprowadzenie grupy sulfonowej w pozycie C6 i utworzenie wiązania wegiel - siarka przeprowadziłam na dwa sposoby. Bromopochodna 49 charakteryzuje się małą rozpuszczalnością w wodzie, dlatego dodawanie soli nieorganicznej należy prowadzić w temperaturze 80 °C jako stężony wodny roztwór. W innym przypadku wprowadzenie soli nieorganicznej w postaci krystalicznej powodowało wysalanie roztworu i reakcja nie zachodziła. Druga, przetestowaną przeze mnie metodą przyłączania grupy sulfonowej do pochodnej glukozy było użycie wodorosiarczynu potasu w obecności 18-korony-6 jako katalizatora kompleksującego jony potasu. Jednakże w tak prowadzonym procesie nie uzyskałam zadowalających efektów. Ze względu na zwiększoną reaktywność substratu reakcja nie była regioselektywna, a to skutkowało powstawaniem produktów ubocznych. W obu metodach oczyszczanie produktu na jonicie Amberlite IRA 400 [OH-] prowadziło do otrzymania pożądanego produktu – 2-acetamido-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozydu benzylu 50, ale z różnymi wydajnościami. Otrzymany, chroniony sulfonowy analog D-glukopiranozydu benzylu 50 był kluczowym intemediatem do otrzymania pożądanych pochodnych. Ogrzewanie do wrzenia w roztworze kwasu solnego związku 50 pozwoliło na usuniecie grup ochronnych. W ten sposób otrzymałam pochodną 2-amino-2,6-dideoksy-D-6-sulfoglukopiranozę 51a, którą przekształciłam w ester 51b oraz alkohol 53. Ester metylowy 2-amino-2,6-dideoksy-D-6sulfoglukopiranozy 52a otrzymałam działając związek 51a na trimetoksymetanem w roztworze metanolowym, natomiast alkohol 53 poprzez redukcję borowodorkiem sodu. Z drugiej strony, intermediat 50 był prekursorem kolejnych dwóch kolejnych pochodnych 52b oraz 54. Po hydrogenolizie w standardowych warunkach otrzymałam N-acetylo-2-amino-2,6-dideoksy-D-6sulfoglukopiranozę 52a, którą przekształciłam w ester 52b oraz alkohol 54 w sposób identyczny do opisanego dla zwiazku 51a. Wszystkie zsyntezowane

związki zostały oczyszczone, a następnie zliofilizowane. Ich struktury potwierdziłam na podstawie widm NMR oraz mas.

Związki **51a-54** zostały przetestowane pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej techniką wielokrotnych rozcieńczeń. Minimalne stężenie hamujące (MIC) określono na pożywce RPMI-1640 (dla grzybów) i Mueller-Hinton (dla bakterii). Związki **51a**, **52a**, **53**, **54** wykazywały umiarkowaną aktywność przeciwgrzybową i przeciwbakteryjną, a wartości MIC mieściły się w zakresie 0.125 – 2.0 mg ml⁻¹ (**Tabela 2**). Pochodna **53** w większości przypadków była bardziej aktywna niż niezredukowana pochodna glukozy **51a**, z której została otrzymana. Jeśli natomiast porówna się parami wartości MIC dla związków **51a** i **52a** oraz **53** i **54** można zauważyć, iż *N*-acetylowanie nieznacznie poprawiło aktywność przeciwbakteryjną pochodnych. Estry metylowe (**51b** oraz **52b**) okazały się natomiast nieaktywne biologicznie. Pozostałe wyniki badań oraz modelowania molekularnego zostały opublikowane w literaturze.¹⁸³ Badania na aktywność przeciwgrzybową i selektywną toksyczność zostały wykonane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej oraz w Katedrze Mikrobiologii, Immunologii i Genetyki Uniwersytetu Wiedeńskiego.

	Wartość MIC (mg ml ⁻¹)							
Związek	Szczepy bakterii				Szczepy grzybów			
	SA	SE	EC	PA	CAL	CG	СК	CAR
5 1a	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	2.0	1.0	0.5
51b	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0
52a	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	0.25	0.25	0.25
52b	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0
53	0.25	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5	0.5
54	0.125	0.25	0.5	0.25	1.0	0.5	0.5	0.25

Tabela 2. Aktywność przeciwgrzybowa i przeciwbakteryjna pochodnych 51a-54.

SA – Staphylococcus aureus; SE – Staphylococcus epidermidis; EC – Escherichia coli; PA – Pseudomonas aeruginosa; CAL- Candida albicans; CG – Candida glabrata; CK – Candida krusei; CAR – Candida arborea

4. Synteza koniugatów makrolidów polienowych z nanonośnikami

We współpracy z dr inż. Andrzejem Skwareckim otrzymaliśmy dwanaście koniugatów amfoterycyny B i nystatyny A₁ z tzw. 'parasolami molekularnymi' (**Rysunek 13**). Założyliśmy, że koniugaty makrolidów polienowych z 'parasolami molekularnymi' będą się charakteryzować lepszym działanie w błonie komórki grzybowej, co powinno wpływać na selektywną toksyczność antybiotyków. Wykorzystane przeze mnie do tworzenia koniugatów parasole molekularne, pochodne spermidyny oraz kwasów deoksycholowego (**55-58**) lub cholowego (**59, 60**), zawierające łączniki ω -aminokwasowe o różnej długości łańcucha węglowego zostały zsyntezowane w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej przez dr inż. Andrzeja Skwareckiego w oparciu o prace Janouta *et al.*⁹⁶ oraz Okahaty *et al.*¹⁸⁴



Rysunek 13.



Metodykę przyłączania makrolidów polienowych do 'parasoli molekularnych' opracowałam w oparciu o pracę Janouta et al.185 bazując na standardowych metodach tworzenia wiązania amidowego, pomiędzy grupami aminową parasola i karboksylową makrolidu. Jako wyjściowe substraty wykorzystałam Fmoc-NYS 1 oraz Fmoc-AmB 4. Do aktywowania grupy karboksylowej próbowałam zastosować estry aktywne N-hydroksysukcynimidylowe oraz 3,4-dihydro-4-okso-1,2,3-benzotriazyn-3-ylowe. Stosunkowo popularna technika DCC-NSU okazała się nieprzydatną do tworzenia wiązania amidowego pomiędzy makrolidami a 'parasolami molekularnymi', ponieważ w takiej reakcji powstawała mieszanina wielu produktów, z której nie mogłam wyizolować właściwego. Natomiast aktywacja grupy karboksylowej poprzez tworzenie estru

aktywnego przy użyciu TDBTU [tetrafluoroboran *N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametylo-*O*-(3,4dihydro-4-okso-1,2,3-benzotriazyn-3-yl)uroniowy] w środowisku zasadowym prowadziła do otrzymania pożądanych produktów. A)



Rysunek 14. Chromatogram ESI-MS przykładowego związku **69** – koniugatu nystatyny A₁ z 'parasolem molekularnym' pochodną kwasu deoksycholowego i łącznikiem 6-aminoheksanoilowym; A) – chromatogram HPLC; B) – widmo mas pomierzone dla głównego piku o czasie retecji 12.73 min; C) – obraz wiązki zawierającej pozorny pik molekularny [M+1] w widmie mas związku **69** o masie 1914.2991

Otrzymane estry **61**, **62** izolowałam poprzez wytrącanie eterem dietylowym i bezpośrednio używałam do sprzęgania z parasolami molekularnymi **55–58** oraz **59–60** (**Schemat 44**). Przebieg reakcji monitorowałam za pomocą TLC, a po ukończeniu sprzęgania do mieszaniny reakcyjnej dodawałam piperydyny w celu usunięcia grupy ochronnej Fmoc.

Produkty oczyszczałam wykorzystując technikę PLC. W ten sposób otrzymałam serię nowych, poza jednym 74, koniugatów amfoterycyny B 63-66, 71–72 i nystatyny A₁ 67–70, 73–74 z parasolami molekularnymi o różnej długości łącznika ω-aminokwasowego. Struktury otrzymanych połączeń potwierdziłam poprzez analizę widm ¹H NMR oraz spektrometrią mas. Ponadto została wyznaczona czystość otrzymanych koniugatów za pomocą HPLC/MS. Przykładowy chromatogram ESI-MS (Rysunek 14) został wykonany dla koniugatu nystatyny A1 z 'parasolem molekularnym' pochodnej kwasu deoksycholowego i łącznikiem 6-aminoheksanoilowym 69. Elektrorozpylanie (ESI) jest techniką zaliczaną do łagodnych metod jonizacji i zwykle nie powoduje ono fragmentacji badanych cząsteczek, dlatego też jest bardzo często stosowane w badaniach nad związkami wielkoczasteczkowymi. Jak widać na załączonym chromatogramie koniugat 69 jonizuje w trybie dodatnim, a sygnał o czasie retencji równym 12.73 min ma masę 1915.3065 (M+1) odpowiadającą związkowi o wzorze C108H179N5O23. Otrzymane pochodne były przekazane do badań na aktywność przeciwgrzybową oraz selektywną toksyczność względem krwinek ludzkich.

4.1. Wyniki badań biologicznych

Badania na aktywność przeciwgrzybową i selektywną toksyczność zostały wykonane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.¹⁸⁶

Wszystkie koniugaty **63-74** zostały przetestowane pod kątem aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* na szczepie *C. albicans* SC 5314 i pożywce RPMI-1640, dla których określono wartości MIC₈₀. W warunkach przeprowadzania testów (inkubacja przez 24 godziny w 37 °C w pożywce RPMI-1640 buforowanej do p*H* 7.0) nie obserwowano tworzenia się izo-nystatyny – kontrola HPLC. Ponadto te same związki zostały przetestowane także pod kątem aktywności hemolitycznej wobec ludzkich erytrocytów, a wartość EH₅₀ określono jako miarę tej aktywności. Indeks selektywnej toksyczności zdefiniowano jako EH₅₀ [µM] / MIC₈₀ [µM] (**Tabela 3**). Wszystkie koniugaty **63-74** wykazywały niższą aktywność przeciw szczepowi *Candida* niż związki wyjściowe – amfoterycyna B i nystatyna A₁. Najniższą różnicę pomiędzy wartościami MIC₈₀ stwierdzono w przypadku koniugatów 66, 71 i 72. Pod względem stężeń molowych MIC tych związków były prawie takie same, jak w przypadku macierzystego antybiotyku. Co ciekawe, w przypadku koniugatów makrolidów polienowych z parasolami molekularnymi na bazie kwasu deoksycholowego (63-66), długość łacznika ω-aminokwasowego określa aktywność przeciwgrzybową. Koniugaty z krótkimi łącznikami 63 (n = 1), 64 (n = 2), wykazały znacznie niższą aktywność niż ich odpowiedniki z dłuższymi łącznikami – 65 (n = 4) i 66 (n = 6). Natomiast koniugaty z parasolami molekularnymi na bazie kwasu cholowego 71 (n = 4) i 72 (n = 6) wykazywały podobne działanie przeciwgrzybowe do substancji referencyjnej. Wszystkie koniugaty nystatyny A1 były zdecydowanie mniej aktywne niż sama NYS A1, a MIC₈₀ najbardziej aktywnego koniugatu **68** (n = 2) był prawie dziewieciokrotnie wyższy niż NYS A₁.

Tabela	3.	Aktywność	przeciwgrzybowa	oraz	hemolityczna	dla	AmB,	nystatyny	oraz	ich
koniuga	tów	z 'parasolan	ni molekularnymi'.							

Związek	AmB	63	64	65	66	71	72
$\frac{MIC_{80}}{[\mu g m L^{-1}/\mu M]}$	0.3/	7.1/	5.5/	1.8/	0.9/	1.0/	0.6/
	0.32	3.8	2.0	0.94	0.46	0.52	0.44
EH ₅₀	4.0/	8.5/	12/	15/	31/	42/	64/
[μg mL ⁻¹ /μM]	4.3	4.6	6.4	7.85	16	22	32.5
i.s.t.	13.4	1.2	3.19	8.35	34.8	42.3	73.9
Związek	NYS	67	68	69	70	73	74
$\frac{MIC_{80}}{[\mu g m L^{-1}/\mu M]}$	0.8/	18/	14/	33/	38/	45/	127/
	0.86	9.62	7.42	17.2	19.6	23.5	64.3
EH ₅₀	41/	6.5/	5.0/	24/	37/	47/	NO
[μg mL ⁻¹ /μM]	44.3	3.5	2.65	12.5	19.1	24.5	
i.s.t.	51.5	0.36	0.36	0.73	0.94	1.04	-

i.s.t - indeks selektywnej toksyczności, NO - nie określono.

Paradoksalnie, najniższą aktywność stwierdzono dla koniugatu NYS **74**, który jest odpowiednikiem najbardziej aktywnego koniugatu AmB **72**. Stwierdzono jakościową różnicę między czynnościami hemolitycznymi koniugatów AmB i NYS A₁. Te pierwsze były mniej hemolityczne niż AmB, podczas gdy wartości EH₅₀ tych drugich były niższe niż NYS A₁. Indeks selektywnej toksyczności trzech koniugatów AmB **66**, **71** i **72** był lepszy niż dla AmB, podczas gdy dla większości pochodnych nystatyny A₁ wartości EH₅₀ były niższe niż MIC₈₀, czego konsekwencją jest niższa selektywna toksyczność wszystkich koniugatów NYS A₁ niż samej substancji referencyjnej.

Koniugaty, które posiadały najlepsze właściwości **66**, **68** i **72** przebadano pod kątem aktywności przeciwgrzybowej dla siedmiu gatunków *Candida* i *Sacharomyces cerevisiae* (**Tabela 4**). W większości przypadków wartości MIC dla koniugatów **66** i **72** były wyższe niż wartości dla AmB, szczególnie różnica ta była widoczna w przypadku gatunku *C. tropicalis*. Interesujący jest fakt, że wartości MIC koniugatów **66** oraz **72** przeciwko szczepowi *C. albicans B4*, lekoopornemu ze względu na nadekspresję genu MDR1, były 2-4 krotnie wyższe niż w przypadku nie opornego.

	MIC_{50} [µg ml ⁻¹]					
	AmB	66	72	NYS	68	
C. albicans ATCC 10231	0.3	0.7	0.25	0.7	12	
C. albicans B3	0.3	0.8	0.4	1.0	13	
C. albicans B4	0.4	2.3	1.3	1.2	10	
C. glabrata	0.3	2.7	1.3	0.45	16	
C. krusei	0.5	3.0	1.5	0.9	17	
C. parapsilosis	0.6	0.7	1.7	1.1	15	
C. tropicalis	0.4	12.5	24	0.8	3.4	
S. cerevisiae	0.2	0.75	0.6	0.7	3.0	
		MIC ₈	₀ [μg	ml ⁻¹]		
	AmB	66	72	NYS	68	
C. albicans ATCC 10231	0.4	0.8	0.5	1.0	15	
C. albicans B3	0.5	0.9	0.75	1.1	15	
C. albicans B4	0.5	3.6	1.6	0.9	15	
C. glabrata	0.4	3.6	1.7	0.8	22	
C. krusei	0.6	3.75	1.8	1.0	31	
C. parapsilosis	0.7	1.2	0.9	1.3	16	
C. tropicalis	0.5	16	32	1.4	4.0	
S cerevisiae	0.3	0.95	0.8	0.7	3.8	

Tabela 4. Aktywność przeciwgrzybowa *in vitro* dla wybranych koniugatów **66**, **68**, **72** oraz AmB i NYS A₁.

Wybrane koniugaty (64, 66, 68 oraz 72) przebadano pod kątem cytotoksyczności wobec trzech linii komórek ssaczych: komórek nabłonkowych nerki świni LLC-PK1, ludzkich embrionalnych komórek nerki HEK-293T i ludzkich komórek raka wątrobowokomórkowego HepG2 (Tabela 5). Wszystkie koniugaty AmB były mniej cytotoksyczne niż AmB. Różnica pomiędzy wartościami IC₅₀ koniugatów 64, 66 i 72, a wartością IC₅₀ dla AmB była szczególnie duża w przypadku komórek Hep G2, a najniższa w komórkach LLC-PK1. Natomiast koniugat NYS 68 był mniej cytotoksyczny niż sama nystatyna A₁ tylko w stosunku do komórek Hep G2.

Związek	$IC_{50}\pm SD \ [\mu g \ ml^{-1}]$						
	komórki HEK-293T	komórki LLC-PK1	komórki Hep G2				
AmB	0.488 ± 0.101	2.688 ± 0.950	0.565 ± 0.111				
64	16.708 ± 3.571	8.471 ±1.204	>50				
66	5.565 ± 0.253	6.454 ± 0.992	25.209 ±2.313				
68	17.742 ± 2.642	15.411 ± 1.018	33.071 ±2.907				
NYS	6.173 ± 0.602	11.652 ± 2.332	7.864 ± 0.540				
72	2.176 ± 0.122	2.505 ± 0.397	16.102 ± 4.089				

Tabela 5. Cytotoksyczność AmB, NYS oraz ich koniugatów wobec trzech linii komórek ssaczych.

Podsumowując koniugaty AmB z 'parasolami molekularnymi' wykazują lepszą selektywną toksyczność niż sam antybiotyk. Z drugiej strony, zastosowanie tej samej strategii do konstruowania koniugatów z nystatyną A₁ nie spowodowało podobnego efektu, ponieważ otrzymane koniugaty wykazywały znacznie gorsze działanie przeciwgrzybicze i wyższą cytotoksyczność wobec komórek ssaczych niż sama NYS. Obserwacja ta jest kolejnym dowodem na to, że strategie modyfikacji chemicznej AmB mające na celu poprawę selektywnej toksyczności tego antybiotyku nie mogą być bezpośrednio przeniesione na cząsteczkę nystatyny A₁, pomimo widocznej analogii strukturalnej między tymi antybiotykami.

5. Podsumowanie i wnioski końcowe

Celem badań, których wyniki opisano w niniejszej rozprawie doktorskiej było zaplanowanie ścieżek syntetycznych oraz otrzymanie pochodnych cukrowych, które posłużyły do zbadania możliwości chemicznych modyfikacji podstawników aminocukrowych w makropierścieniach amfoterycyny B oraz nystatyny A_1 .

Sprawdziłam możliwość zastosowania różnych grup ochronnych do selektywnej osłony grup funkcyjnych makrolidów polienowych. Ich duża labilność i wrażliwość na wysoką temperaturę, światło oraz silnie zasadowe i kwaśne pH, wymagała ode mnie przetestowania i zoptymalizowania warunków reakcji, tak aby podczas modyfikacji cząsteczka makrolidu nie ulegała rozkładowi. Zmodyfikowałam zoptymalizowałam warunki i reakcii wprowadzania grup ochronnych do cząsteczki makrolidów polienowych. Ponadto przetestowałam różne warunki przyłączania podstawników cukrowych oraz niecukrowych do aglikonu amfoterycyny B. Wykorzystując właściwości nukleofilowe grupy hydroksylowej otrzymanego aglikonu AmB sprawdziłam możliwość utworzenia pochodnych z następującymi związkami: 3-fluoroaniliną, 3-amino-1-propanolem oraz bromkiem 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-D-glukozy. Wybrane pochodne okazały się zbyt mało reaktywne, a reakcja substytucji nukleofilowej zarówno z węglanem cezu jak i wodorkiem sodu, nie prowadziła do otrzymania nowych pochodnych AmB. Sprawdziłam możliwość utworzenia wiązania glikozydowego pomiędzy pochodnymi cukrowymi, a otrzymanym aglikonem amfoterycyny B w wyniku reakcji dehydracyjnej glikozylacji. Substratami wykorzystanymi do reakcji były otrzymane przeze mnie cukry: 2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranoza, 2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranoza, 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-D-glukopiranoza, 2,3,4,6-tetra-O-benzylo-D-glukopiranoza oraz 3-azydo-2,3,6-trideoksy-D-ksyloza. Opracowałam i zoptymalizowałam warunki syntezy chronionych pochodnych cukrowych, będacych dogodnymi substratami do reakcji z aglikonem amfoterycyny B. Standardowymi metodami ochroniłam grupy hydroksylowe cukrów oraz selektywnie wprowadziłam grupę azydowa.

Ponadto zoptymalizowałam metodę syntezy koniugatów amfoterycyny B oraz nystatyny A₁ z 'parasolami molekularnymi'. Używana procedura obejmowała ochronę grupy aminowej makrolidu polienowego, generowanie estru aktywnego z TDBTU, tworzenie wiązania amidowego z cząsteczką 'parasola molekularnego', a następnie usunięcie grupy ochronnej. Zaproponowana ścieżka syntezy tego typu pochodnych jest selektywna i wydajna. Koniugaty makrolidów polienowych z pochodnymi kwasu doksycholowego oraz połączenia nystatyny $A_1 \ z$ 'parasolami molekularnymi'zostały opisane po raz pierwszy.

Podsumowując, na podstawie prac badawczych przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy, można sformułować następujące wnioski:

- 1. Wykorzystanie zaplanowanych, zmodyfikowanych procedur umożliwiło otrzymanie całkowicie chronionego aglikonu AmB z grupą hydroksylową na atomie węgla C19. Intermediat ten jest dogodnym substratem do dalszych reakcji modyfikacji podstawnika cukrowego.
- 2. Struktura nystatyny A₁ jest na tyle labilna, że nie można selektywnie wprowadzić ochron sililowych na grupy hydroksylowe, a co za tym idzie nie jest możliwe otrzymanie chronionego aglikonu tego makrolidu.
- 3. Reakcja substytucji nukleofilowej pomiędzy aglikonem amfoterycyny B oraz pochodnymi 3-fluoroaniliny, 3-amino-1-propanolu i bromkiem 2,3,4,6–tetra-*O*-acetylo-D-glukopiranozylu okazała się nieprzydatna do otrzymywania zmodyfikowanych chemicznie makrolidów polienowych.
- 4. Wykorzystując reakcję dehydracyjnej glikozylacji możliwe było otrzymanie zmodyfikowanych amfoterycyn B, w których do aglikonu przyłączone są cząsteczki 2,3,4,6-tetra-*O*-benzylo-D-glukopiranozy oraz 3-azydo-2,3,6-trideoksy-D-ksylozy.
- 5. Zaplanowane drogi syntetyczne doprowadziły do otrzymania pochodnych 3-azydo-: D-allopiranozy, D-glukopiranozy oraz D-ksylozy.
- Możliwe jest otrzymanie połączeń makrolidów polienowych z nanonośnikami typu 'parasoli molekularnych' pochodnymi kwasów żółciowych, w których łącznikiem są ω-aminokwasy.
- Przeprowadzając regioselektywnie reakcje na cząsteczce *N*-acetylo-Dglukozaminy możliwe było otrzymanie następujących pochodnych: 2-amino-2,6-dideoksy-D-6-sulfoglukopiranozy, *N*-acetylo-2-amino-2,6dideoksy-D-6-sulfoglukopiranozy oraz estrów metylowych obydwu pochodnych, a także kwasy: 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-sulfonowy i *N*-acetylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-sulfonowy.

Otrzymane pochodne – koniugaty makrolidów z 'parasolami molekularnymi' oraz pochodne 6-sulfo-D-glukozaminy i glukitoli zostały poddane badaniom biologicznym, wykonanymi przez dr inż. Marcina Serockiego i mgr inż. Dorotę Martynow z Katedry Technologii Leków i Biochemii PG oraz w Katedrze Mikrobiologii, Immunologii i Genetyki Uniwersytetu Wiedeńskiego. Badania aktywności przeciwgrzybowej i selektywnej toksyczności, pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- 1. Wszystkie koniugaty makrolidów polienowych z 'parasolami molekularnymi' wykazywały niższą aktywność przeciw szczepowi *Candida* niż związki wyjściowe amfoterycyna B i nystatyna A₁.
- W makrolidach polienowych połączonych z 'parasolami molekularnymi' na bazie kwasu deoksycholowego, długość łącznika ω-aminokwasowego określa aktywność przeciwgrzybową. Koniugaty z krótkimi łącznikami, wykazały znacznie niższą aktywność niż ich odpowiedniki z dłuższymi łącznikami.
- 3. Wszystkie przebadane koniugaty AmB były mniej cytotoksyczne niż cząsteczka amfoterycyny B.
- 4. Estry metylowe otrzymanych pochodnych 6-sulfo-D-glukozaminy i glukitoli były nieaktywne biologicznie.
- 5. *N*-acetylowane pochodne 6-sulfo-D-glukozaminy i glukitoli posiadały nieznacznie wyższą aktywność przeciwbakteryjną niż ich odpowiedniki bez grupy acetylowej.

Część eksperymentalna

1. Aparatura

Magnetyczny rezonans jądrowy. Widma jedno- i dwuwymiarowe ¹H i ¹³C NMR, zostały wykonane w Międzyuczelnianym Laboratorium NMR Politechniki Gdańskiej, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku, za pomocą Unity 500 plus firmy Varian (500 MHz), a także w Katedrze Chemii Nieorganicznej Politechniki Gdańskiej przy użyciu Bruker Avance III HD 400 MHz. Jako wzorzec wewnętrzny stosowano tetrametylosilan.

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

Spektrometria mas. Analizę HRMS-ESI przeprowadzono na aparacie Aqilent Technologies 6540 UHD Accurate – Mass Q-TOF LC/MS.

Polarymetr. Skręcalność płaszczyzny światła spolaryzowanego zmierzono za pomocą aparatu Rudolph Autopol II przy długości fali λ =589 nm.

Kriometr. Temperaturę topnienia ciał stałych zmierzono techniką otwartej kapilary. Otrzymane temperatury topnienia związków nie były korygowane.

Płytki TLC i żel krzemionkowy. Do chromatografii TLC zastosowano płytki aluminiowe TLC Silica gel 60 F254 firmy Merck o grubości 0.2 mm. Do chromatografii kolumnowej zastosowano żel krzemionkowy Geduran®Si 60 (40-63 μ m) firmy Merck. Do cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej używano płytek szklanych pokrytych żelem Silica gel 60 firmy Merck o grubości 0.5; 1 oraz 2 mm.

Lampa UV. Do detekcji płytek TLC stosowano lampę UV Benda Typ Nu-4 KL o długości fali λ =254 oraz 366 nm.

Wywoływacze płytek TLC. Jako wywoływaczy płytek TLC użyto: ninhydrynę, roztwór KMnO₄, pary jodu oraz roztwory: molibdenowo-cerowy i anyżowy.

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

2. Synteza chronionych aglikonów makrolidów polienowych

Uwaga: Wszystkie reakcje prowadzone były w atmosferze gazu obojętnego – argonu, w bezwodnych rozpuszczalnikach.

2.1. N-(9-Fluorenylmetoksykarbonylo)-makrolid polienowy – procedura ogólna

0.1 mmola makrolidu polienowego oraz 70 mg (0.2 mmola) F-moc sukcynimidu rozpuszczono w 6 ml mieszaniny DMF:MeOH (2:1 v/v) i dodano 0.56 ml (0.7 mmola) pirydyny. Powstały roztwór mieszano przez 12 h w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę wkroplono do 140 ml eteru dietylowego w 0 °C. Wytrącony osad odsączono i suszono pod próżnią przez 1 h, a następnie użyto do kolejnego etapu bez dodatkowego oczyszczania.

N-(9-Fluorenylmetoksykarbonylo)-nystatyna A₁(1)



Wychodząc z 100 mg (0.1 mmola) nystatyny A_1 otrzymano 110 mg (0.09 mmol, 92%) oleistego ciała stałego $R_f 0.45$ (CHCl₃:MeOH:H₂O 4:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m*/z obliczone dla C₆₂H₈₅NO₁₉: 1147.5716; znalezione 1148.5803 $[M+1]^+$

¹H NMR (pirydyna- d_5) δ [ppm]: 7.83 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.67 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.19 (m, 2H), 6.96 – 5.53 (m, 12H), 4.95 – 3.99 (m, 16H), 3.84 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 3.66 – 3.50 (m, 2H), 3.38 – 3.12 (m, 3H), 2.98 – 1.77 (m, 30H), 1.57 – 1.38 (m, 6H), 1.30 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.15 – 1.00 (m, 4H), 0.83 (d, J = 13.7 Hz, 3H).

N-(9-Fluorenylmetoksykarbonylo)-amfoterycyna B (4)



Wychodząc z 100 mg (0.11 mmola) amfoterycyny B otrzymano 118 mg (0.10 mmola, 95%) produktu 4, R_f 0.45 (CHCl₃:MeOH:H₂O 4:1:0.1 v/v).

MS-ESI: *m/z* obliczone dla C₆₂H₈₃NO₁₉: 1145.5559; znalezione 1146.5641 [M+1]⁺.

¹H NMR (pirydyna- d_3) δ [ppm]: 8.49 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.86 – 7.79 (m, 2H), 7.69 (dd, J = 11.3 i 7.6 Hz, 2H), 7.38 (dd, J = 13.7 i 7.1 Hz, 2H), 7.26 – 7.19 (m, 2H), 6.83 – 6.29 (m, 14H), 5.86 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.53 (dd, J = 15.0 i 10.1 Hz, 2H), 5.34 – 5.27 (m, 1H), 5.25 – 5.15 (m, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.95 – 4.85 (m, 1H), 4.71 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 4.57 – 4.45 (m, 2H), 4.45 – 4.37 (m, 2H), 4.31 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.18 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 4.08 (t, J = 9.6Hz, 2H), 3.69 (dt, J = 19.5 i 8.3 Hz, 2H), 3.43 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 2.99 (t, J =10.4 Hz, 1H), 2.73 – 2.82 (m, 7H), 2.67 (m, 7H), 2.51 – 2.40 (m, 2H), 2.28 – 1.94 (m, 6H), 1.92 – 1.69 (m, 5H), 1.55 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 1.48 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.30 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.26 (d, J = 7.1 Hz, 3H).

2.2. Ketal metylowy makrolidu polienowego - procedura ogólna

Pochodną Fmoc-makrolidu polienowego (0.12 mmola) rozpuszczono w 8 ml mieszaniny THF:MeOH (1:1 v/v). Otrzymany roztwór ochłodzono do 0 °C, a następnie dodano 15 mg (0.05 mmola) kwasu kamforosulfonowego. Przez 2 h utrzymywano temperaturę 0 °C, a następnie dodano 8 μ l (0.06 mmola) TEA. Wytrącony osad odsączono, a powstałą mieszaninę zatężano do momentu wypadania produktu, wtedy wkroplono ją do eteru dietylowego. Otrzymany osad odsączono i suszono dodając kilkukrotnie acetonitrylu (3×15 ml), a następnie odparowując rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Osad suszono pod zmniejszonym ciśnieniem (6 mm Hg) przez 8 h.

Ketal metylowy nystatyny $A_1(2)$



Wychodząc z 140 mg (0.12 mmola) pochodnej Fmoc-NYS **1** otrzymano 107 mg (0.09 mmola, 76%) żółtego, oleistego ciała stałego $R_f 0.45$ (CHCl₃:MeOH:H₂O 4:1:0.1 v/v).

¹H NMR (pirydyna-d₅) δ [ppm]: 7.83 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.67 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.19 (m, 2H), 6.96 – 5.53 (m, 12H), 4.95 – 3.99 (m, 16H), 3.84 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 3.66 – 3.50 (m, 2H), 3.38 – 3.12 (m, 3H), 3.05 (s, 3H) 2.98 – 1.77 (m, 29H), 1.57 – 1.38 (m, 6H), 1.30 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.15 – 1.00 (m, 4H), 0.83 (d, J = 13.7 Hz, 3H).

Ketal metylowy amfoterycyny B (5)



¹H NMR (pirydyna- d_5) δ [ppm]: 7.87 – 7.80 (m, 2H), 7.67 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 7.38 (dt, J = 12.8 i 6.3 Hz, 2H), 7.22 (m, 2H), 6.82 – 6.27 (m, 14H), 5.87 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 5.69 (dd, J = 15.0 i 9.5 Hz, 1H), 5.53 (dd, J = 15.1 i 10.2 Hz, 1H), 5.31 (dd, J = 21.6 i 12.1 Hz, 1H), 5.09 (dd, J = 15.1 i 7.1 Hz, 1H), 5.03 (m, 1H), 4.95 – 4.87 (m, 1H), 4.76 – 4.68 (m, 2H), 4.57 – 4.48 (m, 4H), 4.31 (dd, J = 14.4 i 7.2 Hz, 1H), 4.09 (dd, J = 17.2 i 7.7 Hz, 2H), 3.80 – 3.52 (m, 2H), 3.28 (s, 3H), 3.06 – 2.95 (m, 1H), 2.86 – 2.43 (m, 6H), 2.30 – 1.69 (m, 12H), 1.55 (dt, J = 9.8 i 4.9 Hz, 3H), 1.49 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.46 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.30 (dt, J = 10.5 i 5.2 Hz, 3H).

2.3. Eter nonatrietylosililowy makrolidu polienowego - procedura ogólna

Ketal metylowy makrolidu polienowego (0.09 mmola) zawieszono w 3 ml rozpuszczalnika i dodano 0.28 ml (2.4 mmola) 2,6-lutydyny. Otrzymaną zawiesinę ochłodzono do 0 °C i powoli wkroplono 0.39 ml (2 mmole) TESOTf. Po 3 h do mieszaniny reakcyjnej dodano wodnego, nasyconego roztworu NaHCO₃ (7 ml). Otrzymaną emulsję rozcieńczono eterem dietylowym (13 ml), a powstałe

warstwy rozdzielono. Następnie do warstwy organicznej dodano 5 ml NaHCO₃, przeekstahowano, a powstałe warstwy rozdzielono. Warstwę organiczną przemyto trzema porcjami wody (10 ml), a następnie suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany olej oczyszczano przy pomocy PLC w układzie heksan:eter dietylowy (3:1 v/v) ($R_f 0.55$ heksan:eter dietylowy (3:1 v/v)).

Eter nonatrietylosililowy nystatyny A1(3)



100 mg (0.09 mmola) związku **2** zawieszono w heksanie i postępowano zgodnie z procedurą ogólną – otrzymano 15 mg (0.007 mmola, 8%) związku **3** w postaci oleju.

¹H NMR (pirydyna- d_5) δ [ppm]: 7.91 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.77 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 7.49 – 7.44 (m, 2H), 7.38 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 6.10 – 6.64 (m, 12H), 5.84 – 5.64 (m, 4H), 5.49 – 5.35 (m, 2H), 4.85 – 4.07 (m, 18H), 3.96 – 3.42 (m, 10H), 2.30 – 1.92 (m, 12H), 1.51 – 0.52 (m, 147H).

Eter nonatrietylosililowy amfoterycyny B (6a)



100 mg (0.09 mmola) pochodnej **5** zawieszono w chlorku metylenu, a następnie postępowano zgodnie z procedurą ogólną – otrzymano 97 mg (0.04 mmola, 51%) związku **6** w postaci żółtego oleju, który suszono

pod zmniejszonym ciśnieniem (6 mmHg) przez 8 h do zestalenia. $R_{\rm f}$ 0.46 heksan:eter dietylowy (2:1 v/v).

MS-ESI: m/z obliczone dla C₁₁₇H₂₁₁Si₉NO₁₉: 2186.3499; znalezione 2209.4 [M+Na]⁺

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 7.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.60 – 6.01 (m, 12H), 5.80 (dd, *J* = 15.7 i 4.7 Hz, 1H), 5.38 – 5.29 (m, 1H), 5.00 (dd, *J* = 16.7 i 10.9 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.52 – 4.31 (m, 6H), 4.23 (dd, *J* = 13.9 i 7.3 Hz, 2H), 4.08 – 3.80 (m, 4H), 3.73 – 3.39 (m, 3H), 3.28 (tt, *J* = 19.9 i 10.0 Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 2.58 – 2.37 (m, 3H), 2.31 (dd, *J* = 13.8 i 6.7 Hz, 1H), 2.08 – 1.49 (m, 9H), 1.33 – 1.16 (m, 8H), 1.09 – 0.81 (m, 93H), 0.78 – 0.44 (m, 54H).



Jako drugi związek uzyskano żółty olej zidentyfikowany jako produkt **6b** (40 mg, 0.02 mmola 25%)

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 7.79 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.43 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 6.60 – 6.01 (m, 12H), 5.80 (dd, J = 15.7 i 4.7 Hz, 1H), 5.38 – 5.29 (m, 1H), 5.00 (dd, J = 16.7 i 10.9 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.52 – 4.31 (m, 6H), 4.23 (dd, J = 13.9 i 7.3 Hz, 2H), 4.08 – 3.80 (m, 4H), 3.73 – 3.39 (m, 3H), 3.28 (tt, J = 19.9 i 10.0 Hz, 1H), 2.58 – 2.37 (m, 3H), 2.31 (dd, J = 13.8 i 6.7 Hz, 1H), 2.08 – 1.49 (m, 9H), 1.33 – 1.16 (m, 8H), 1.09 – 0.81 (m, 93H), 0.78 – 0.44 (m, 54H).

2.4. Ester allilowy N-Fmoc-nona-O-trietylosilylo-O-metylo-amfoterycyny B (7)



170 mg (0.08 mmola) związku 6 rozpuszczono temperaturze W pokojowej w 3 ml mieszaniny DMF:MeOH (10:1)v/v) temperaturze pokojowej. w Następnie do otrzymanego roztworu dodano 0.06 ml (0.34 mmola) DIPEA

i wkroplono 0.26 ml (3 mmole) bromku allilu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 12 h w temperaturze 5 °C. Po upływie tego czasu mieszaninę poreakcyjną wylano na 9 ml roztworu wody i nasyconego roztworu NaHCO₃ (1:1 v/v). Fazę wodną ekstrahowano 4×4 ml eteru dietylowego. Połączone fazy organiczne przemyto 5 ml solanki i suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany surowy olej czyszczono za pomocą PLC w eluencie heksan:eter dietylowy (10:1 v/v). Oczyszczony związek 7 kilkakrotnie zalano benzenem, co spowodowało jego sproszkowanie. Powstały osad suszono przez 8 h pod zmniejszonym ciśnieniem (6 mm Hg). Otrzymano 110 mg (0.05 mmola, 63%) pochodnej 7 R_f 0.85 (heksan:eter dietylowy 4:1 v/v).

MS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₂₀H₂₁₅Si₉NO₁₉: 2226.4; znalezione 2249.4 [M+Na]⁺

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 7.79 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.43 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 6.57-6.50 (m, 2H) 6.40 – 6.01 (m, 14H), 6.06 – 5.99 (m, 1H) 5.80 (dd, J = 15.7 i 4.7 Hz, 1H), 5.38 – 5.29 (m, 1H), 5.00 (dd, J = 16.7 i 10.9 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.52 – 4.31 (m, 6H), 4.23 (dd, J = 13.9 i 7.3 Hz, 2H), 4.08 – 3.80 (m, 4H), 3.73 – 3.39 (m, 3H), 3.28 (tt, J = 19.9 i 10.0 Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 2.58 – 2.37 (m, 3H), 2.31 (dd, J = 13.8 i 6.7 Hz, 1H), 2.08 – 1.49 (m, 9H), 1.33 – 1.16 (m, 8H), 1.09 – 0.81 (m, 93H), 0.78 – 0.44 (m, 54H).

2.5. Chroniony heptaenon (8)



160 mg (0.07 mmola) związku 7 rozpuszczono w 5 ml bezwodnego THF i dodano 234 mg (0.72 mmola) węglanu cezu. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 24 mg (0.11 mmola) DDQ i całość mieszano przez 20 minut

w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną wylano na 7 ml nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu, a powstałą emulsję rozcieńczono 15 ml wody i ekstrahowano chlorkiem metylenu (10×10 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto solanką (6 ml), wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu i odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany olej oczyszczono za pomocą PLC w układzie heksan:eter (3:1 v/v) R_f 0.44 (heksan:eter 3:1 v/v). Otrzymany olej kilkukrotnie zadano 4 ml benzenu, odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono przez 2h pod zmniejszonym ciśnieniem (6 mmHg). Otrzymano 70 mg (0.04 mmola, 60%) czerwonego związku **8**.

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 7.79 (dd, J = 15.7 i 11.1 Hz, 1H), 7.06 (dd, J = 21.9 i 7.5 Hz, 1H), 6.73 (dd, J = 14.8 i 9.9 Hz, 1H), 6.57 – 6.46 (m, 2H), 6.38 – 5.92 (m, 10H), 5.39 (dd, J = 17.2 i 1.5 Hz, 1H), 5.33 – 5.23 (m, 2H), 4.67 (dd, J = 5.7 i 1.3 Hz, 2H), 4.47 (td, J = 10.5 i 4.7 Hz, 2H), 4.22 – 4.11 (m, 1H), 4.06 – 3.93 (m, 2H), 3.85 – 3.74 (m, 2H), 3.57 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 3.23 – 3.13 (m, 1H), 2.92 (s, 3H), 2.59 (dd, J = 17.8 i 3.7 Hz, 1H), 2.45 – 2.33 (m, 3H), 2.00 – 1.15 (m, 17H), 1.14 – 0.38 (m, 111H).
2.6. Chroniony aglikon amfoterycyny B (9)



100 mg (0.06 mmola) związku **8** rozpuszczono w 4 ml bezwodnej mieszaniny THF:MeOH (3:1 v/v), ochłodzono do 0 °C i dodano 23 mg (0.6 mmola) borowodorku sodu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez

30 minut w temperaturze pokojowej i obserwowano zmianę barwy z czerwonej na żółtą. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną wylano na 5 ml nasyconego roztworu chlorku amonu. Powstałą emulsję rozcieńczono eterem dietylowym (15 ml). Fazę organiczną przemyto 3×8 ml wodą, a następnie 7 ml solanki. Połączone fazy wodne powtórnie ekstrahowano 2×10 ml eteru dietylowego. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 80 mg (0.05 mmola, 80%) żółtego oleju **9** R_f 0.4 (heksan:eter 3:1 v/v).

MS-ESI: *m/z* obliczone dla C₈₇H₁₆₆Si₇O₁₄: 1631.0662; znalezione 1654.1 [M+Na]⁺

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6.42 – 5.88 (m, 12H), 5.50 – 5.34 (m, 1H), 5.32 – 5.24 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.72 – 4.52 (m, 3H), 4.30 (m, 2H), 4.03 – 3.87 (m, 6H), 3.77 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 3.61 – 3.44 (m, 2H), 3.08 (m, 3H), 2.54 – 2.36 (m, 3H), 1.97 – 1.41 (m, 3H), 1.37 – 1.13 (m, 17H), 1.08 – 0.45 (m, 111H).

3. Synteza niecukrowych pochodnych

3.1. N-tert-butoksykarbonylo-4-fluoroanilina (13)

 $\begin{array}{c} F \\ & 1 \hspace{0.5mm} g \hspace{0.5mm} (9 \hspace{0.5mm} mmoli) \hspace{0.5mm} \textit{m-fluoroaniliny rozpuszczono w 10 \hspace{0.5mm} ml} \\ & bezwodnego \hspace{0.5mm} etanolu, a następnie wkroplono roztwór 2.95 \hspace{0.5mm} g \hspace{0.5mm} (13.5 \hspace{0.5mm} mmola) \hspace{0.5mm} Boc_2 O \hspace{0.5mm} w \hspace{0.5mm} 10 \hspace{0.5mm} ml \hspace{0.5mm} bezwodnego \hspace{0.5mm} EtOH. \hspace{0.5mm} Reakcję \hspace{0.5mm} prowadzono \hspace{0.5mm} w \hspace{0.5mm} temperaturze \hspace{0.5mm} pokojowej \hspace{0.5mm} przez \hspace{0.5mm} 48 \hspace{0.5mm} h. \hspace{0.5mm} Produkt \hspace{0.5mm} oczyszczono \hspace{0.5mm} za \hspace{0.5mm} a \hspace{0.5mm} pomocą \hspace{0.5mm} chromatografii \hspace{0.5mm} cieczowej \hspace{0.5mm} na \hspace{0.5mm} żelu \hspace{0.5mm} krzemionkowym \hspace{0.5mm} w \hspace{0.5mm} układzie \hspace{0.5mm} heksan: AcOEt \hspace{0.5mm} 9:1 \hspace{0.5mm} v/v. \hspace{0.5mm} Otrzymano \hspace{0.5mm} 1.73 \hspace{0.5mm} g \hspace{0.5mm} (8 \hspace{0.5mm} mmoli, \hspace{0.5mm} 91\%) \hspace{0.5mm} białego \hspace{0.5mm} osadu \hspace{0.5mm} 12 \hspace{0.5mm} ott \hspace{0.5mm} 130-132^{\circ}C \hspace{0.5mm} R_{f} \hspace{0.5mm} 0.64 \hspace{0.5mm} (heksan: AcOEt \hspace{0.5mm} 8:2 \hspace{0.5mm} v/v). \end{array}$

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 7.34 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 7.24 (td, J = 8.2, 6.5 Hz, 1H), 7.03 – 6.97 (m, 1H), 6.75 (tdd, J = 8.3, 2.5, 0.9 Hz, 1H), 6.53 (bs, 1H), 1.55 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 164.44, 152.36, 139.9, 130.00, 113.65, 109.74, 109.53, 105.96, 105.69, 80.97, 28.30.

3.2. 3-[(N-tert-butoksykarbonylo)amino]-1-propanol (14)

 $\begin{array}{ccc} & & & \\ HO & & & \\ H & &$ (6.48 g, 30 mmoli) w 15 ml bezwodnego CH₂Cl₂. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4 h. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym w układzie heksan:AcOEt 6:4 v/v. Otrzymano 4.1 g (24 mmole, 89%) oleju **13** R_f 0.72 (heksan:AcOEt 6:4 v/v).

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 4.89 (s, 1H), 3.66 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 3.28 (q, J = 6.2 Hz, 2H), 3.16 (s, 1H), 1.67 (quint, J = 6 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).

3.3. Metanosulfonian 3-[(N-tert-butoksykarbonylo)amino]-1-propylu (16)

i mieszanine ochłodzono do 0 °C. Nastepnie wkroplono 1

ml (13 mmoli) chlorku metanosulfonowego. Reakcję mieszano przez 2 h w temperaturze 0 °C, a następnie w temperaturze pokojowej przez kolejne 2 h. Po zakończeniu reakcji do mieszaniny dodano 50 ml wody i ekstrahowano AcOEt (3x50 ml). Warstwy organiczne połączono, wysuszono siarczanem magnezu, a rozpuszczalnik odparowano. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym w układzie heksan: AcOEt 8:2 v/v. Uzyskano 1.8 g (7 mmoli, 58%) białego osadu 16 o tt poniżej 30°C; Rf 0.42 (heksan:AcOEt 9:1 v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₉H₁₉NO₅S: 253.0984; znalezione 254.1014 $[M+1]^+$

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 4.78 (s, 1H), 4.30 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.27 (dd, *J* = 11.9, 5.9 Hz, 2H), 3.04 (s, 3H), 1.95 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 155.98, 67.41, 52.56, 37.38, 28.38, 27.41, 8.61

4. Synteza pochodnej 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksylozy

4.1. O-metylo-2-deoksy-D-ryboza (27) – według zmodyfikowanego przepisu z lit¹⁶⁵



W kolbie zabezpieczonej przed dostępem wilgoci ochłodzono do 0 °C 100 ml bezwodnego metanolu, a następnie wkroplono 10 ml chlorku acetylu. Tę mieszaninę reakcyjną mieszano przez 10 minut w łaźni lodowej, a następnie przez 30 minut pokojowej. Następnie kolbę z mieszaniną reakcyjną

w temperaturze pokojowej. Następnie kolbę z mieszaniną reakcyjną pozostawiono w temperaturze -20 °C przez kolejne 30 minut. Po upływie tego czasu dodano 3 g (37.3 mmola) 2-deoksy-D-rybozy w jednej porcji i mieszano w temperaturze pokojowej do momentu rozpuszczenia się cukru, po czym pozostawiono mieszaninę reakcyjną w temperaturze -20 °C przez 18 h. Po zakończeniu reakcji do mieszaniny poreakcyjnej dodano nasyconego roztworu Na₂CO₃ do momentu uzyskania odczynu obojętnego. Stałe sole nieorganiczne odsączono, a przesącz oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 40 ml AcOEt i przemyto wodą, aby oddzielić sole nieorganiczne. Otrzymano 3.3 g (37.3 mmola, 100%) oleju **27**. R_f 0.7 (AcOEt:heksan 1:1 v/v), $[\alpha]_D^{25} +35$ (*c*1, CHCl₃).

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₆H₁₂O₄: 148.0736; znalezione 149.0548 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.14 (m, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.73 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.15 (m, 1H), 2.04 (dd, *J* = 16.8 i 1.5 Hz, 1H).

4.2. O-metylo-2,5-dideoksy-5-jodo-D-ryboza (28)

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.

mieszaninę heksan:AcOEt 6:4 v/v. Otrzymano 1 g (3.8 mmola, 57%) oleju **28**, R_f 0.47 (heksan:AcOEt 1:1 v/v), $[\alpha]_D^{25}$ +20 (*c*1, CHCl₃).

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₆H₁₁IO₃: 257.9735; znalezione 259.0124 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.14 (m, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.39 (dd, *J* = 12.3 i 1.6 Hz, 3H), 3.27 (m, 2H), 2.28 (m, 1H), 2.04 (dd, *J* = 17.3 i 7.8 Hz, 1H).

4.3. O-metylo-2,3,5-trideoksy-D-ryboza (29)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₅H₉N₃O₂: 143.0695; znalezione 144.0379 [M+1]⁺⁻

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.11 – 5.05 (m, 2H), 4.26 – 4.17 (m, 2H), 4.01 (m, 2H), 3.89 (bs, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 2.31 – 1.96 (m, 4H), 1.32 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.20 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

4.4. O-metylo-3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksyloza (31)

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.



0.5 g (3.78 mmola) związku **29** rozpuszczono w 20 ml bezwodnego dichlorometanu. Roztwór ochłodzono do -60 °C intensywnie mieszając, a następnie dodano 0.6 ml (7.56

mmola) pirydyny i wkroplono powoli 0.95 ml (5.67 mmola) Tf₂O. Po zakończeniu wkraplania bezwodnika mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury 0 °C przez 2 h, a następnie rozcieńczono zawartość kolby 50 ml chloroformu i 50 ml 2N HCl. Warstwę organiczną oddzielono, przemyto wodą, wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość zawierającą pochodną **30** rozpuszczono w 10 ml DMF, dodano 740 mg (11.34 mmola) azydku sodu i powstałą zawiesinę mieszano w temperaturze

112

pokojowej przez 2 h. Po zakończeniu reakcji odsączono nadmiar azydku sodu, roztwór zatężono, a pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym w eluencie heksan:eter dietylowy 2:1 v/v. Otrzymano 290 mg produktu **31** (1.84 mmola, 49% po dwóch etapach), który udało rozdzielić się na dwa anomery w stosunku masowym 1:1, α : R_f 0.59; β : R_f 0.50 (AcOEt:heksan 3:7 v/v)

Anomer α : ¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.12 (dd, J = 5.7 i 3.1 Hz, 1H), 4.21 (qt, J = 9.7 i 4.9 Hz, 1H), 3.92 (ddd, J = 6.6 i 4.1 i 2.4 Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 2.36 (ddd, J = 14.7; 5.7 i 2.4 Hz, 1H), 2.25 (ddd, J = 14.7 i 6.7 i 3.1 Hz, 1H), 1.36 (d, J = 6.3 Hz, 3H).

Anomer β : ¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.01 (dd, J = 5.8 i 1.5 Hz, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.98 (ddd, J = 7.2; 5.1 i 2.3 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.38 (ddd, J = 14.3; 7.0 i 5.9 Hz, 1H), 2.18 (m, 1H), 1.39 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

4.5. 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksyloza (19)

N₃ WOH

50 mg (0.32 mmola) związku **31** rozpuszczono w 2 ml 80% kwasu octowego. Następnie roztwór ogrzano do temperatury 60°C, którą utrzymywano przez 30 minut. Po tym czasie

mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej, oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono za pomocą PLC w układzie heksan:AcOEt (7:3 v/v). Otrzymano 30 mg (0.21 mmola, 67%) produktu **19**, który był mieszaniną dwóch anomerów oraz formy liniowej.

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₅H₉N₃: 143.0695; znalezione 144.0489 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.66 (dd, J = 5.3 i 3.3 Hz, 1H), 5.41 (t, J = 6.6 Hz, 0.4H), 4.38 (qd, J = 6.3, 4.3 Hz, 1H), 4.18 – 4.09 (m, 0.4H), 4.04 – 3.91 (m, 2H), 2.43 – 2.14 (m, 3H), 1.43 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 1.33 (d, J = 6.3 Hz, 3H).

5. Synteza pochodnych 3-azydo-3-deoksy-D-heksoz

5.1. 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-α-D-glukofuranoza (33)



Związek **33** otrzymano wg lit.¹⁸⁷ jako biały bezpostaciowy osad o tt 106.2-107.8 °C (heksan); $[\alpha]_D^{25}$ -12 (*c*1, CHCl₃)

lit. tt 106-7 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -12 (*c*1, CHCl₃) ¹⁸⁷

5.2. 1,2;5,6-di-O-izopropylideno-3-okso-α-D-glukofuranoza (40)

Związek **40** otrzymano wg lit.¹⁷⁰ Produkt izolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan:AcOEt 1:1 v/v. Otrzymano białe kryształy o tt 99.8-101.8 °C (AcOEt/heksan); $[\alpha]_D^{25}$ +35 (*c*1, CHCl₃); R_f 0.57 (AcOEt/heksan 1:1 v/v).

lit. tt 127-9 °C, wyd. 94%, ¹⁷⁰ tt 108-112 °C, $[\alpha]_D^{25}$ +40 (c2, CHCl₃)¹⁶⁹

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 4.42 - 4.46 (m, 1H), 4.38 - 4.40 (m, 1H), 4.34 - 4.38 (m, 2H), 4.08 - 4.16 (m, 2H), 1.34 - 1.44 (s, 12H)

5.3. 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-α-D-allofuranoza (41)



Związek **41** otrzymano wg lit.¹⁷⁰ W wyniku redukcji powstają dwa produkty, które rozdzielono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan/octan etylu 2:1 v/v.

Po krystalizacji z CHCl₃/heksan; otrzymano białe kryształy o tt 73.1-74.9 °C, $[\alpha]_D^{25}$ +38 (*c*1, CHCl₃), R_f 0.45 (AcOEt/heksan 1:1 v/v). lit. olej¹⁶⁹

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.83 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.67 – 4.58 (m, 1H), 4.39 – 4.26 (m, 1H), 4.19 – 3.98 (m, 3H), 3.83 (dd, J = 8.5 i 4.7 Hz, 1H), 2.57 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 1.60 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.39 (s, 3H).

5.4. 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-*O*-trifluorometanosulfonylo-α-D-furanoza – procedura ogólna

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.

1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-α-D-furanozę (5.15 mmola) rozpuszczono w 100 ml bezwodnego CH₂Cl₂ i dodano 1.6 ml (19.6 mmola) pirydyny, mieszaninę reakcyjną ochłodzono do -10 °C, a następnie powoli wkroplono 1.2 ml (7.21 mmola) Tf₂O i mieszano do osiągnięcia temperatury pokojowej. Po zakończeniu reakcji do mieszaniny poreakcyjnej dodano 200 ml nasyconego roztworu NaHCO₃, po czym ekstrahowano ją 3×100 ml CH₂Cl₂. Następnie warstwę organiczną przemyto 120 ml wody. Frakcje organiczne połączono, suszono nad siarczanem magnezu, a następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany olej oczyszczano stosując chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym w układzie heksan:eter dietylowy (2:1 v/v).

1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-*O*-trifluorometanosulfonylo-α-D-glukofuranoza (34)



Wychodząc z 1.34 g (5.15 mmola) substratu **33** otrzymano 1.92 g produktu **34** (4.8 mmola, 95%) o tt 69.8-71.4 °C, $[\alpha]_D^{25}$ -43 (*c*1, CHCl₃); R_f 0.58 heksan:eter dietylowy (2:1 v/v).

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₃H₁₉F₃SO₈: 392.0753; znalezione 393.0357 [M+1]⁺⁻

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6.01 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.28 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.78 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.27 - 4.13 (m, 3H), 3.99 (dd, *J* = 8.6, 4.2 Hz, 1H), 1.53 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.35 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 123.15, 119.97, 116.79, 113.62, 113.10, 109.84, 104.99, 88.16, 83.23, 79.87, 77.22, 71.69, 67.58, 26.77, 26.54, 26.22, 24.83.

1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-*O*-trifluorometanosulfonylo-α-D-allofuranoza (42)



Wychodząc z 2 g (7.7 mmola) 1,2;5,6-di-O-izopropylideno- α -Dallofuranozy (**41**) otrzymano produkt **42** w postaci oleju (2.55 g, 6.5 mmola, 85%), R_f 0.42 (heksan:Et₂O 2:1 v/v)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₁₃H₁₉F₃SO₈: 392.0753; znalezione 393.0387 [M+1]^{+.}

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.86 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.93 (dt, *J* = 9.6, 4.8 Hz, 1H), 4.79 (dd, *J* = 5.1, 3.9 Hz, 1H), 4.25 – 4.11 (m, 3H), 3.96 – 3.90 (m, 1H), 1.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.37 (s, 3H)

5.5. 1,2;5,6-di-O-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy-α-D-allofuranoza (34a)



3 g (7.6 mmola) związku **34** rozpuszczono w mieszaninie 15 ml DMF i 1.5 ml H₂O, a następnie dodano 4.96 g (76 mmoli) azydku sodu. Mieszaninę reakcyjną termostatowano w temperaturze 90 °C przez 15 h.

Po ochłodzeniu zawiesiny dodano do niej 80 ml wody i czterokrotnie ekstrahowano chloroformem (4×80 ml). Połączone frakcje organiczne przemyto wodą (4×20 ml), a następnie wysuszono przy użyciu siarczanu magnezu. Chloroform odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując surowy, oleisty produkt, który oczyszczano przy użyciu chromatografii kolumnowej. Fazę

stacjonarną stanowił żel krzemionkowy, zaś jako eluent zastosowano heksan – produkt opuszczał kolumnę jako drugi. Uzyskano 1.2 g (4.2 mmola, 60%) produktu **35a** w postaci zestalającego się oleju; $[\alpha]_D^{25}$ +59 (*c*1, CHCl₃)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{12}H_{19}N_3O_5$: 285.1325; znalezione 258.1403 $[M-N_2+1]^+$

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.81 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.75 (dd, *J* = 4.6 i 3.8 Hz, 1H), 4.19 (m, 2H), 4.07 – 3.96 (m, 2H), 3.55 (dd, *J* = 9.1 i 4.8 Hz, 1H), 1.60 (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.38 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 113.25, 110.09, 103.94, 80.57, 78.06, 77.23, 75.77, 66.76, 62.61, 26.50, 26.44, 26.28, 25.07.



Jako drugi związek uzyskano białe kryształy o tt 42 °C zidentyfikowane jako produkt eliminacji **35b** (500 mg, 2 mmola 50%)

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6.10 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.26 (dd, *J* = 2.3 i 1.1 Hz, 1H), 4.60 (dd, *J* = 6.8 i 5.8 Hz, 1H), 4.17 (dd, *J* = 8.4 i 6.8 Hz, 1H), 3.99 (dd, *J* = 8.4 i 5.8 Hz, 1H), 1.49 (s, 6H), 1.46 (s, 3H), 1.41 (s, 3H).

5.6. 1,2;5,6-di-O-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy-α-D-glukofuranoza (43)



1.9 g (4.8 mmola) pochodnej triflatowej **42** rozpuszczono w mieszaninie tetrahydrofuranu (30 ml) i wody (2 ml), a następnie dodano 2.5 g (38.7 mmola) azydku sodu. Zawiesinę ogrzewano przez 24 h. Po zakończeniu reakcji

produkt izolowano w analogiczny sposób jak związek **34**. Produkt **43** oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, jako eluent stosując heksan. Otrzymano 990 mg (3.5 mmola, 70%) oleju **43**, o $[\alpha]_D^{25}$ -37 (*c*1, CHCl₃); R_f 0.39 w układzie heksan:eter dietylowy 2:1 v/v. lit. $[\alpha]_D^{25}$ -36 (*c*0.65, CHCl₃);¹⁷¹ olej.¹⁷⁰

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{12}H_{19}N_3O_5$: 285.1325, znalezione 258.1623 $[M-N_2+1]^+$

IR $\nu_{N=N=N}\,2100\;cm^{\text{-1}}\,(\text{lit. IR KBr}\,\nu_{N=N=N}\,2100\;cm^{\text{-1}})^{171}$

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 5.88 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.64 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.18 – 4.09 (m, 3H), 4.00 (dd, *J* = 8.7 i 4.8 Hz, 1H), 1.54 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.35 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 112.27, 109.54, 105.03, 83.40, 80.47, 77.27, 73.03, 67.63, 66.34, 26.85, 26.63, 26.17, 25.14.

5.7. 3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd allilu – procedura ogólna

4.4 mmole 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-furanozy rozpuszczono w 12.5 ml H₂O oraz 1.25 ml stęż. HCl i termostatowano w temperaturze 60 °C przez 2 h. Po tym czasie rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości – zestalającego się oleju dodano 7 ml alkoholu allilowego oraz 0.09 ml stęż. H₂SO₄. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 100 °C przez około 2.5 h. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano 13.5 mg (0.09 mmola) stałego K₂CO₃, a następnie oddestylowano nadmiar alkoholu pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej. Fazę stacjonarną stanowił żel krzemionkowy, zaś jako eluent zastosowano chloroform, a następnie chloroform:metanol (10:1 v/v).

3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd allilu (36)



HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₉H₁₅N₃O₅: 245.1012, znalezione 244.0961 [M-1]⁻

¹H NMR (MeOH- d_4) δ [ppm]: 6.04 – 5.90 (m, 1H), 5.38 – 5.28 (m, 1H), 5.20 – 5.14 (m, 1H), 4.57 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.43 – 4.32 (m, 1H), 4.14 – 4.10 (m, 1H), 4.08 – 4.05 (m, 1H), 3.83 (dt, J = 5.6 i 2.8 Hz, 1H), 3.72 – 3.62 (m, 2H), 3.51 (dd, J = 7.9 i 3.5 Hz, 1H), 2.03 (s, 1H).

3-azydo-3-deoksy-a-D-glukopiranozyd allilu



Z 500 mg (1.75 mmola) 1,2;5,6-di-O-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-allofuranozy otrzymano 216 mg (0.87 mmola, 50%) 3-azydo-3-deoksy- α -D-glukopiranozyd allilu; R_f 0.55 (CHCl₃:MeOH 8:1 v/v)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₉H₁₅N₃O₅: 245.1012; znalezione 246.1138 [M+1]⁺⁻

¹H NMR (CD₃OD) δ [ppm]: 6.04 – 5.90 (m, 1H), 5.41 – 5.31 (m, 1H), 5.21 – 5.15 (m, 1H), 4.84 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.26 – 4.22 (m, 1H), 4.14 – 3.98 (m, 2H), 3.80 (dd, J = 11.8 i 2.3 Hz, 1H), 3.70 – 3.54 (m, 3H), 3.46 – 3.39 (m, 1H).

5.8. 2,4,6-tri-*O*-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd allilu – procedura ogólna

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.

(1.6 mmola) 3-azydo-3-deoksy-D-piranozydu allilu rozpuszczono w 10 ml bezwodnego CH₂Cl₂, otrzymaną mieszaninę reakcyjną ochłodzono do 0 °C, dodano 0.8 ml (9.6 mmola) pirydyny, a następnie powoli wkroplono 6.4 mmola odczynnika sililującego. Reakcję prowadzono przez 1 h w 0 °C, a następnie 1 h w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę wylano na 20 ml nasyconego roztworu NaHCO₃, powstałe fazy rozdzielono. Fazę organiczną przemyto 10 ml H₂O, a następnie wysuszono nad siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany olej oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent heksan, a następnie mieszaninę heksan:eter dietylowy 2:1 v/v.

2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd allilu (37)



0.94 (heksan:eter dietylowy 5:1 v/v).

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6.03 – 5.83 (m, 1H), 5.29 (ddd, J = 17.2 i 3.3 i 1.6 Hz, 1H), 5.22 – 5.12 (m, 1H), 4.55 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 4.33 (ddt, J = 12.5 i 5.4 i 1.5 Hz, 1H), 4.07 (ddt, J = 12.5 i 6.1 i 1.3 Hz, 1H), 3.89 – 3.81 (m, 2H), 3.74 (m, 2H), 3.60 – 3.53 (m, 2H), 0.99 (m, 27H), 0.73 – 0.53 (m, 18H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 134.32, 116.99, 99.55, 74.50, 7 2.03, 70.02, 68.43, 67.60, 62.15, 6.73, 4.79, 4.52.

2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd allilu



Z 400 mg (1.7 mmola) 3-azydo-3-deoksy-Dglukopiranozydu allilu otrzymano 400 mg (0.7 mmol, 41%) produktu w postaci oleju $R_f 0.84$ (heksan:eter dietylowy 2:1 v/v).

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.91 - 5.78 (m, 1H), 5.12 - 5.08 (m, 1H), 5.04 - 4.96 (m, 1H), 4.69 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.58 (dd, J = 7.0 i 5.1 Hz, 1H), 3.93 - 3.16 (m, 7H), 1.07 - 0.91 (m, 27H), 0.79 - 0.54 (m, 18H).

2,4,6-tri-*O*-(*tert*-butylodimetylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd allilu



Do 400 mg (1.7 mmola) 3-azydo-3-deoksy-Dglukopiranozydu allilu użyto 965 mg (6.4 mmola) TBSCl i otrzymano 700 mg (1.19 mmola, 70%) oleju $R_f 0.88$ (heksan:eter dietylowy 2:1 v/v).

```
R: TBS
```

HRMS-ESI: *m*/*z* obliczone dla C₂₇H₅₇N₃O₅Si₃: 587.3606; znalezione 588.3495 [M+1]⁺⁻

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6.00 – 5.87 (m, 1H), 5.38 – 5.30 (m, 1H), 5.25 – 5.20 (m, 1H), 4.75 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.26 – 4.18 (m, 1H), 4.05 – 3.99 (m, 1H), 3.88 (dd, *J* = 10.4, 4.8 Hz, 1H), 3.80 – 3.66 (m, 2H), 3.54 (dd, *J* = 9.9, 3.5 Hz, 1H), 3.45 – 3.38 (m, 1H), 3.13 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 0.92 (s, 27H), 0.12 (d, *J* = 1.4 Hz, 18H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]:133.66, 118.05, 97.33, 72.28, 71.52, 70.12, 68.57, 66.95, 64.49, 25.88, 25.70, 25.65, 18.30, 18.06, 17.98, -3.57, -4.68, -4.89, -5.45, -5.49.

5.9. 3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd 4-pentenylu – procedura ogólna

Do 3.15 mmola 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-furanozy dodano 9 ml H₂O oraz 0.9 ml stęż. HCl i termostatowano w temperaturze 60 °C przez 2 h, a następnie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 3 mmole (97%) zestalającego się oleju, do którego dodano 4 ml (39 mmoli) 4-penten-1-olu oraz 7 mg (0.03 mmola) kwasu kamforosulfonowego. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 100 °C przez około 18 h. Po tym czasie dodano kilka kropel trietyloaminy, a następnie

oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej. Fazę stacjonarną stanowił żel krzemionkowy, zaś jako eluent stosowano chloroform, a następnie chloroform:metanol (10:1 v/v)

3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (38)



Wychodząc z 900 mg (3.15 mmola) 1,2;5,6-di-*O*izopropylideno-3-azydo-3-deoksy-α-D-allofuranozy otrzymano 413 mg (1.5 mmola, 50%) anomeru α związku **38**.

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₁₁H₁₉N₃O₅: 273.1325; znalezione 274.1361 [M+1]⁺⁻

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.93 – 5.72 (m, 1H), 5.11 – 4.97 (m, 2H), 4.63 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.27 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.19 (dd, *J* = 7.3 i 4.0 Hz, 1H), 3.98 – 3.66 (m, 5H), 3.64 – 3.53 (m, 1H), 2.59 (bs, 3H), 2.26 – 2.06 (m, 2H), 1.80 – 1.61 (m, 2H).

3-azydo-3-deoksy-a-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (44)



Wychodząc z 1.5 g (5.3 mmola) 1,2;5,6-di-Oizopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-glukofuranozy **43** po dwóch etapach otrzymano 730 mg (2.7 mmola, 51%) produktu **44** będącego mieszaniną anomerów α i β w stosunku 1:1 w postaci oleju R_f 0.55 (CHCl₃:MeOH 8:1

v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{11}H_{19}N_3O_5$: 273.1325; znalezione 274.1361 [M+1]⁺⁻

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.84 (ddt, J = 16.9 i 10.2 i 6.6 Hz, 2H), 5.13 – 4.97 (m, 4H), 4.87 (d, J = 3.4 Hz, 1H, Hα), 4.35 (d, J = 7.3 Hz, 1H, Hβ), 3.98 – 3.36 (m, 16H), 2.22 – 2.10 (m, 4H), 1.84 – 1.64 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 137.91, 137.76, 115.29, 115.15, 102.90, 97.70, 75.87, 73.15, 71.78, 71.04, 69.78, 69.20, 68.94, 68.20, 67.87, 67.53, 62.14, 62.01, 30.33, 30.11, 28.66, 28.50.

5.10. 2,4,6-tri-*O*-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd 4-pentenylu – procedura ogólna

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.

Piranozyd 4-pentenylu (1.8 mmola) rozpuszczono w 20 ml bezwodnego CH₂Cl₂, otrzymaną mieszaninę reakcyjną ochłodzono do 0 °C, dodano 1.3 ml (15.6 mmola) pirydyny, a następnie powoli wkroplono 1.9 ml (10.1 mmola) TESOTf. Reakcję prowadzono przez 1 h w 0 °C, a następnie 1 h w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę wylano na 20 ml nasyconego roztworu NaHCO₃, powstałe fazy rozdzielono. Fazę organiczną przemyto 10 ml H₂O, a następnie wysuszono nad siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany olej oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent-heksan, a następnie w gradientu heksan:octan etylu (30:1 v/v do 20:1 v/v).

2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39)



Wychodząc z 500 mg (1.8 mmola) allopiranozydu 4-pentenylu **38** otrzymano 670 mg (1.1 mmola, 61%) produktu w postaci oleju $R_f 0.34$ heksan:eter dietylowy (30:1 v/v).

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: δ 5.95 – 5.74 (m, 1H), 5.10 – 4.91 (m, 2H), 4.52 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.94 – 3.34 (m, 8H), 2.29 – 2.05 (m, 2H), 1.84 – 1.62 (m, 2H), 1.00 (m, 27H), 0.76 – 0.53 (m, 18H).

2,4,6-tri-*O*-trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45)



Wychodząc z 166 mg (0.6 mmola) 3-azydo-3-deoksy- α -Dglukopiranozydu 4-pentenylu otrzymano 166 mg (0.3 mmola, 50%) produktu **45** będącego mieszaniną anomerów α i β w stosunku 1:1 produktu w postaci oleju. R_f0.77 w układzie heksan:octan etylu 40:1 v/v.

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.93 - 5.74 (m, 2H), 5.12 - 4.93 (m, 4H), 4.69 (d, J = 3.5 Hz, 1H, Hα), 4.22 (t, J = 7.9 Hz, 1H, Hβ), 3.89 - 3.15 (m, 16H), 2.21 - 2.07 (m, 4H), 1.81 - 1.68 (m, 4H), 1.08 - 0.91 (m, 54H), 0.74 - 0.55 (m, 36H).

5.11. 2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna

2,4,6-tri-*O*-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd 4-pentenylu (0.81 mmola) rozpuszczono w 31.7 ml bezwodnego acetonitrylu, a następnie dodano 0.3 ml wody; do powstałego roztworu dodano 432 mg (2.43 mmola) NBS. Po zakończeniu reakcji, której przebieg kontrolowano za pomocą TLC, odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a do pozostałości dodano heksanu (20 ml). Odsączono biały krystaliczny osad, a pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie heksan:eter dietylowy (15:1 v/v).

2,4,6-tri-O-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranoza (20)



Wychodząc z 500 mg (0.81 mmola) substratu **39** otrzymano 240 mg (0.44 mmola, 54%) produktu w postaci oleju $R_f 0.37$ heksan:eter dietylowy (15:1 v/v).

HRMS-ESI: *m*/*z* obliczone dla C₂₄H₅₃N₃O₅Si₃: 547.3293; znalezione 548.3623 $[M+1]^{+1}$

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 4.90 – 4.86 (m, 1H), 3.94 – 3.81 (m, 3H), 3.78 – 3.63 (m, 3H), 3.48 (dd, *J* = 7.5, 3.4 Hz, 1H), 1.08 – 0.91 (m, 27H), 0.74 – 0.58 (m, 18H).

2,4,6-tri-O-trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranoza (21)



Wychodząc z 266 mg (0.4 mmola) substratu **45** otrzymano 170 mg (0.3 mmola, 77%) produktu **21** w postaci oleju. $R_f 0.53$ w układzie heksan:eter dietylowy 5:1 v/v.

HRMS-ESI: *m*/*z* obliczone dla C₂₄H₅₃N₃O₅Si₃: 547.3293; znalezione 548.3612 [M+1]⁺⁻

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.12 - 5.08 (m, 1H), 4.69 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 3.93 - 3.16 (m, 6H), 1.07 - 0.91 (m, 27H), 0.79 - 0.54 (m, 18H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 92.51, 73.08, 72.76, 68.79, 68.14, 61.83, 6.86, 6.74, 6.63, 5.12, 4.79, 4.49.

6. Synteza pochodnych glukozy

6.1. 1,2,3,4,6-penta-O-acetylo-D-glukopiranoza



Otrzymano wg lit.¹⁷⁶ Wychodząc z 2 g (11 mmoli) glukozy otrzymano 3 g (7.7 mmola) produktu z wydajnością 69%. Produkt izolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan:AcOEt

7:3 v/v. Otrzymano białe kryształy o t
t 107-110°C (AcOEt/heksan); $[\alpha]_D^{25}$ +105 (c1, CHCl₃); R_f0.8 (AcOEt)

lit. tt 110-111°C, $[\alpha]_D^{25}$ +101.6 (*c*0.28, CHCl₃) wyd. 72%¹⁷⁶

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6.36 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 5.55 – 5.44 (m, 1H), 5.22 – 5.07 (m, 2H), 4.30 (dd, J = 12.5 i 4.1 Hz, 1H), 4.14 (ddd, J = 12.9 i 8.2 i 2.2 Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H).

6.2. 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-D-glukopiranoza (17)



Otrzymano wg lit.¹¹⁷ wychodząc z 2 g (5.1 mmola) 1,2,34,6-penta-*O*-acetylo-D-glukopiranozy otrzymano 1.2 g (3.4 mmola, 71%) produktu w postaci białego osadu. Produkt izolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu

krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan:AcOEt 3:1 v/v. R_f 0.42 (heksan:AcOEt 3:1 v/v); wydajność lit. 75%.¹¹⁷

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 5.59 – 5.53 (m, 1H), 5.50 (t, J = 3.7 Hz, 1H), 5.14 – 5.07 (m, 1H), 4.94 (ddd, J = 10.2 i 3.6 i 1.2 Hz, 1H), 4.33 – 4.10 (m, 3H), 2.13 – 2.12 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.62 (s, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: δ 170.76, 170.15, 170.08, 169.62, 90.23, 71.01, 69.80, 68.43, 67.34, 61.92, 20.78, 20.73, 20.70, 20.64.

6.3. 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-1-bromo-D-glukopiranoza (12)



Otrzymano wg lit.¹¹⁶ wychodząc z 6 g (33 mmoli) D-glukozy otrzymano 6 g (14.6 mmola) produktu w postaci białego osadu z wydajnością 44%. Produkt izolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan:AcOEt 4:1 v/v. Otrzymano biały osad o tt 87-88 °C (heksan); $[\alpha]_D^{25}$ +180 (*c*1, CHCl₃); R_f 0.4 (heksan:AcOEt 7:3 v/v).

lit. tt 87-88 °C (heksan), $[\alpha]_D^{25}$ +182 (c1, CHCl₃)¹¹⁶

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6.64 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 5.59 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.18 (dd, *J* = 16.1 i 6.6 Hz, 1H), 4.86 (dd, *J* = 10.0 i 4.1 Hz, 1H), 4.40 – 4.27 (m, 2H), 4.19 – 4.09 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 170.50, 169.84, 169.79, 169.46, 86.55, 77.22, 72.14, 70.61, 70.16, 67.17, 20.68, 20.67, 20.63, 20.56.

6.4. 2,3,4,6-tetra-O-benzylo-D-glukopiranoza (18)



Otrzymano wg lit.^{174,177} wychodząc z 3 g (16.5 mmoli) Dglukozy otrzymano 1.3 g (2.4 mmola) produktu w postaci białego osadu **18** o tt 151-152 °C; $R_f 0.31$ (heksan:AcOEt 7:3 v/v) z wydajnością 15% po trzech etapach. Produkt

izolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan: AcOEt 4:6 v/v.

lit. tt 145-149 °C177

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 7.34 (m, 18H), 7.18 – 7.14 (m, 2H), 5.29 – 5.22 (bt, 1H), 4.76 (m, 8H), 3.97 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 3.77 – 3.59 (m, 5H), 2.85 (d, J = 2.3 Hz, 1H).

6.5. 2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozyd benzylu (48)



Związek **48** otrzymano wg lit.¹⁸¹ Po dwukrotnej krystalizacji z absolutnego etanolu, otrzymano produkt z wydajnością 54% o tt 179-181°C, $[\alpha]_D^{25}$ +134 (*c*1, EtOH)

lit. tt 183-184 °C, wyd. 74%, $[\alpha]_D^{25}$ +104 (*c*1, EtOH)¹⁸¹

¹H NMR (MeOH- d_4) δ [ppm]: 8.03 (d, J = 8.2 Hz, NH), 7.27 – 7.39 (m, 5H, C₆H₅), 4.87 (d, J = 3.6Hz, 1H, C1), 4.49 i 4.76 (AB, 2H, <u>CH₂Ph</u>), 3.88 (dt, J = 10.6 i 3.3 Hz, 1H, C2), 3,82 (dd, J = 10.6 Hz, 1H, C6), 3.66 – 3.72 (m, J = 3.6 i 11.6 Hz, 3H, C5, C3, C'6), 3.37 (t, J = 9.1 Hz, 1H, C4), 1.95 (s, 3H, CH₃CO).

6.6. 2-acetamido-6-bromo-2,6-dideoksy-D-glukopiranozyd benzylu (49)



4.5 g (14.45 mmoli) pochodnej 48 oraz 15.1 g (57.19 mmoli) trifenylofosfiny rozpuszczono w 180 ml pirydyny. Do ochłodzonego w łaźni lodowej roztworu dodawano powoli 9.6 g (28.94 mmoli) tetrabromometanu temperatura tak, aby mieszaniny reakcyjnej nie

przekroczyła 65 °C. Po dodaniu całej ilości CBr₄ mieszanine ogrzewano przez 45 minut w temperaturze 60 - 65 °C. Następnie dodano do niej 45 ml metanolu i utrzymywano temperaturę 60 - 65 °C przez kolejne 20 minut. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono i oddestylowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Do powstałego oleju dodawano 210 ml toluenu (3×70 ml), a powstały roztwór dekantowano. Finalnie produkt oczyszczano za pomoca chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Jako eluent stosowano chloroform, a następnie chloroform:metanol (60:1 v/v). Produkt krystalizował z chloroformu w postaci białych, puszystych igieł. Otrzymano 1.2 g (3.2 mmola, 22%) produktu **49** o tt 178-179°C, $[\alpha]_D^{25}$ +174 (*c*1, MeOH)

lit. tt 184-185 °C, wyd. 42%, $[\alpha]_D^{25}$ +100 (c1, MeOH)¹⁸²

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₅H₂₀BrNO₅: 373.0525, znalezione 374.0573 [M+1]+ oraz 376.0573 [M+3]+

¹H NMR (DMSO- d_6) δ [ppm]: 7.88 (d, J = 8.3 Hz, 1H, NH), 7.27 – 7.39 (m, 5H, C_6H_5), 5.37 (d, J = 5.9 Hz, 1H, C4-OH), 4.89 (d, J = 6.3 Hz, 1H, C3-OH), 4.73 (d, J = 3.9 Hz, 1H, C1), 4.67 (d, J = 12.2 Hz, 1H, C3), 4.45 (d, J = 12.7 Hz, 1H, C4), 3.64 (d, J = 8.8 Hz, 1H, C5), 3.62 (m, 2H, CH₂Ph), 3.61 i 3.63 (2×m, 2H, C6), 3.15(q, *J* = 11.2 Hz, 1H, C2), 1.82 (s, 3H, CH₃CO).

6.7. 2-acetamido-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozyd benzylu (50)



Metoda A

400 mg (1.07 mmola) związku 49 zawieszono w 6 mlwody i ogrzewano do temperatury 80 °C przez 3 h, a następnie OBn dodano roztwór 500 mg (3.97 mmoli) siarczynu sodu (Na_2SO_3) 3 ml wody. Mieszanine reakcyjną W kontynuowano ogrzewanie przez kolejne 24 godziny. Następnie roztwór ochłodzono i oczyszczano na jonicie Amberlite IRA 400 [OH-]. Produkt wymywano za pomocą 3% roztworu HCl. Otrzymano 170 mg (0.45 mmola, 43%), produktu 50 w postaci żółtego oleju, Rf 0.8 (octan etylu: kwas octowy: woda 2:1:1 v/v)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₁₅H₂₁NSO₈: 375.0988, znalezione 376.1084 [M+1]⁺

¹H NMR (D₂O) δ [ppm]: 7.19 – 7.26 (m, 5H, C₆H₅), 4.31 (d, J=11.2 Hz, 1H, C1), 4.01(t, J=19.5 Hz, 1H, C3), 3.70 i 4.68 (AB, J=3.4 Hz, 2H, <u>CH₂Ph</u>), 3.54 (t, J=13.2 Hz, 1H, C4), 3.22 (d, J=14.2 Hz, 1H, C5), 3.14 (t, J=19 Hz, 2H, C6), 2.94 (q, J=24.9 Hz, 1H, C2), 1.76 (s, 3H, <u>CH₃CO</u>).

Metoda B

300 mg (0.8 mmola) związku **49** rozpuszczono w 6.5 ml THF, a następnie dodano 260 mg (0.8 mmola) siarczynu potasu i 40 mg (0.15 mmola) 18-korony-6. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano do wrzenia przez 24 h, a następnie ochłodzono i zatężono. Surowy produkt oczyszczano przy pomocy chromatografii jonowymiennej używając jonitu Amberlite IRA 400 [OH⁻]. Produkt wymywano 3% HCl. Otrzymano 50 mg (0.13 mmola, 17%) produktu **50** w postaci żółtego oleju identycznego do produktu otrzymanego metodą A, R_f 0.8 (octan etylu: kwas octowy: woda 2:1:1 v/v).

6.8. 2-amino-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranoza (51a)



500 mg (1.33 mmola) pochodnej **50** rozpuszczono w 4 ml 18% HCl i ogrzewano do wrzenia przez 6 h. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w wodzie

i oczyszczano za pomocą chromatografii jonowymiennej używając Amberlite IRA 400 [OH⁻]. Produkt wymywano 3% roztworem HCl. Otrzymano 194 mg (0.8 mmola, 60%), produktu **51a** w postaci białego osadu będącego mieszaniną anomerów α : β (4:1), R_f0.24 (butanol:kwas octowy:woda 2:1:1 v/v)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₆H₁₃NSO₇: 243.0413, znalezione 376.1084 [M+1]⁺

¹H NMR (D₂O) δ [ppm]: 5.23 (d, J = 3.4 Hz, 1H, C1α), 4.76 (d, J = 8 Hz, 1H, C1β), 4.10 (t, J = 9.8 Hz, 1H, C5α), 3.72 (t, J = 9.4 Hz, 1H, C3α), 3.68 (t, J = 9 Hz, 1H, C3β), 3.55 (t, J = 9 Hz, 1H, C5β), 3.25 (d, J = 1.7 i 14.7 Hz, 1H C6α), 3.12 – 3.20 (m, 4H, C4α, C6β, C2α, C4β), 2.91 (dd, J = 9.8 i 14.7 Hz, 1H, C6°α), 2.9 (dd, J = 10 Hz, 1H, C2β), 2.84 (t, 1H, C6°β).

 ^{13}C NMR (D2O) δ [ppm]: 89.18, 72.54, 69.63, 67.98, 54.30, 52.05

6.9. 2-acetamido-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranoza (52a)



Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze wodoru.

200 mg (0.6 mmola) związku **50** rozpuszczono w 8 ml etanolu i dodano 50 mg 10% Pd/C. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 doby. Po tym czasie

odsączono katalizator, a rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany olej oczyszczano za pomocą preparatywnego TLC w układzie butanol:kwas octowy:woda (8:3:3 v/v). Produkt wymywano z żelu za pomocą 3% kwasu octowego. Po liofilizacji otrzymano 50 mg (0.13 mmola, 17%) produktu **52a** w postaci białego proszku, $R_f 0.4$ (butanol:kwas octowy:woda 4:1:1 v/v).

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₈H₁₅NSO₈: 285.2716, znalezione 284.2623 [M-1]⁻

 1H NMR (D₂O) δ [ppm]: 5.3 (d, 1H), 4.85 (d, 1H), 4.2 (t, 1H), 3.8 (t, 1H), 3.75 (t, 1H), 3.2 (d, 2H), 3.1 (m, 4H), 2.9 (m, 2H), 2.85 (t, 1H).

6.10. Ester metylowy 2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy – przepis ogólny

0.82 mmola 2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy zawieszono w 5 ml metanolu, a następnie dodano 2 ml trimetoksymetanu. Reakcję prowadzono przez 24 h w temperaturze pokojowej, a następnie oddestylowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii preparatywnej TLC (butanol : kwas octowy : woda 4:1:1 v/v).

Ester metylowy 2-amino-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy (51b)



Wychodząc z 200 mg (0.82 mmol) pochodnej **51a** otrzymano 64 mg (0.25 mmola, 30%) produktu **51b** w postaci żółtego oleju, będącego mieszaniną anomerów α : β (1:4), R_f 0.4 (butanol:kwas octowy:woda 4:1:1 v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₈H₁₅NSO₈: 257.0569, znalezione 258.0721 [M+1]⁺

¹H NMR (D₂O: CD₃OD) δ [ppm]: 5.10 (d, J = 3.4 Hz, 1H, C1), 4.10 (t, 1H, C3), 3.95 (t, 1H, C5), 3.4 – 3.6 (m, 3H, C6, C4, C2), 3.35 (s, 3H, SO₃CH₃), 2.95 (m, 1H, C'6).

Ester metylowy 2-acetamido-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy (52b)



Wychodząc z 200 mg (0.7 mmola) pochodnej **52a** otrzymano 73 mg (0.24 mmola, 35%) produktu **52b** w postaci żółtego oleju, będącego mieszaniną dwóch anomerów α : β (1:8), R_f 0.4 (butanol:kwas octowy:woda 4:1:1 v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₉H₁₇NSO₈: 299.0675, znalezione 298.0602 [M-1]⁻

Dla anomeru β ¹H NMR (D₂O) δ [ppm]: 4.5 (d, 1H, C1), 3.5 (s, 3H, SO₃CH₃), 3.3 – 3.4 (m, 3H), 3.13 (m, 3H), 1.75 (s, 3H, CH₃CO).

6.11. Kwas 2-deoksy-D-glukitolo-6-sulfonowy – procedura ogólna

0.38 mmoli 2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy rozpuszczono w 10 ml wody i ochłodzono w łaźni lodowej. Do roztworu dodano małymi porcjami 304 mg (8 mmoli) NaBH₄, a następnie reakcję mieszano w temperaturze pokojowej przez 3 h, po upływie tego czasu dodano kolejną porcję 150 mg (4 mmole) NaBH₄ i mieszano przez kolejne 12 h. Nadmiar borowodorku sodu rozłożono za pomocą rozcieńczonego HCl. Mieszaninę poreakcyjną oczyszczano za pomocą jonitu Amberlite IR 120 [H⁺]. Frakcję zawierającą produkt wymywano wodą.

Kwas 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-sulfonowy (53)



Wychodząc z 100 mg (0.4 mmola) pochodnej **51a** otrzymano 96 mg (0.39 mmola, 96%) produktu **53**, $R_f 0.10$ (butanol:kwas octowy:woda 2:1:1 v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₆H₁₅NSO₇: 245.0596, znalezione 246.0601 [M+1]⁺

 1H NMR (D2O) δ [ppm]: 3.8 (m, 2H), 3.6 (m, 1H), 3.4 (q, 2H), 3.28 (m, 2H), 2.9 (m, 1H).

Kwas N-acetylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-sulfonowy (54)



Wychodząc z 110 mg (0.38 mmola) pochodnej **52a** otrzymano 100 mg (0.34 mmola, 90%) produktu **54**, $R_f 0.14$ (butanol:kwas octowy:woda 2:1:1 v/v). HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₈H₁₇NSO₈: 287.0670, znalezione 288.0670 [M+1]⁺

¹H NMR (D₂O) δ [ppm]: 4.0 (d, 1H), 3.6 – 3.7 (m, 2H), 3.45 (d, 1H), 3.4 (q, 1H), 3.28 (AB, 2H), 2.9 (m, 1H), 2.09 (s, 3H).

7. Łączenie chronionego aglikonu AmB z cząsteczkami cukrów – procedura ogólna

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.

0.07 mmola odpowiedniego cukru rozpuszczono w 5 ml bezwodnego dichlorometanu, dodano sit 3 Å, a następnie 24 mg (0.12 mmola) difenylosulfotlenku, powstały roztwór mieszano przez 4 h w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 18 µl (0.15 mmola) 2,6-lutydyny, a mieszaninę reakcyjną ochłodzono do -60 °C. Po osiągnięciu pożądanej temperatury wkroplono 12 ul (0.07 mmola) bezwodnika trifluorometanosulfonowego. Mieszanine reakcyjna ogrzano do temperatury -20 °C i mieszano przez 1.5 h. W tym czasie w drugiej kolbie rozpuszczono 70 mg (0.035 mmola) aglikonu 9 w 2 ml bezwodnego dichlorometanu i dodano 16 µl (0.14 mmola) 2,6-lutydyny. Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej pochodną cukrową wkroplono powoli roztwór 9 w temperaturze -30 °C. Następnie podniesiono temperaturę mieszaniny reakcyjnej do 0 °C i mieszano w tej temperaturze przez 1 h. Po zakończeniu reakcji mieszaninę wylano do 5 ml nasyconego roztworu NaHCO₃ i ekstrahowano dichlorometanem $(3 \times 15 \text{ ml})$. Połaczone warstwy organiczne przemyto 10 ml H₂O. a następnie suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono za pomoca PLC w układzie heksan: eter dietylowy (3:1 v/v)

7.1. Aglikon AmB połączony z 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksylozą (22)



Wychodząc z 10 mg (0.07 mmola) 3-azydo-2,3,6-trideoksyrybozy oraz 70 mg (0.035 mmola) aglikonu 9 otrzymano 5 mg (0.28 μ mola, 1%) żółtego oleju 22 R_f 0.47 (heksan:eter dietylowy 3:1 v/v).

 $\label{eq:hardenergy} \begin{array}{l} {}^{1}H \ NMR \ (CDCl_{3}) \ \delta \ [ppm]: \ 6.40 - 6.03 \ (m, \ 14H), \ 5.44 - 5.32 \ (m, \ 2H), \ 5.30 - 5.20 \ (m, \ 3H), \ 5.02 \ (s, \ 1H), \ 4.65 - 4.58 \ (m, \ 2H), \ 4.34 - 4.24 \ (m, \ 3H), \ 4.17 \ (m, \ 2H), \ 3.49 \ (s, \ 3H), \ 3.10 - 3.00 \ (m, \ 1H), \ 2.35 - 2.28 \ (m, \ 14H), \ 2.07 - 1.98 \ (m, \ 5H), \ 1.72 \end{array}$

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

- 1.50 (m, 25H), 1.37 - 1.14 (m, 20H), 1.09 - 0.81 (m, 63H), 0.73 - 0.47 (m, 42H).

7.2. Aglikon AmB połączony z 2,3,4,6-tetra-O-benzylo-D-glukopiranozą (23)



Wychodząc z 100 mg (0.18 mmola) benzylopochodnej glukozy **18** oraz 78 mg (0.039 mmola) aglikonu AmB **9** otrzymano 17 mg (7.9 μ mola, 20%) produktu w postaci oleju. R_f 0.53 w układzie heksan:eter dietylowy 3:1 v/v.

MS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₂₀H₁₉₈Si₇O₁₉: 2139.2912; znalezione 2162.3 [M+Na]⁺

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: δ 7.32 (m, 20H), 7.21 – 7.09 (m, 2H), 6.41 – 6.01 (m, 12H), 5.97 – 5.84 (m, 1H), 5.41 (dd, *J* = 15.0, 9.6 Hz, 1H), 5.30 (dd, *J* = 21.9, 10.4 Hz, 1H), 5.18 (m, 1H), 5.04 – 4.22 (m, 15H), 3.95 (dd, *J* = 19.6, 9.8 Hz, 2H), 3.77 – 3.35 (m, 12H), 3.03 (d, *J* = 16.7 Hz, 3H), 2.39 (m, 5H), 1.80 – 1.16 (m, 20H), 1.07 – 0.81 (m, 63H), 0.64 (m, 42H).

8. Tworzenie koniugatów makrolidów polienowych z 'parasolami molekularnymi'

8.1. Ester aktywny TDBTU makrolidu polienowego - procedura ogólna

Do roztworu 0.109 mmola *N*-Fmoc makrolidu polienowego w 5 ml bezwodnego DMF dodano 30 μ l (0.17 mmoli) *N*,*N*-diizopropyloetyloaminy, a następnie 38 mg (0.109 mmola) TDBTU. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę poreakcyjną wkroplono do 200 ml eteru dietylowego. Wytrącony osad odsączono i użyto do kolejnego etapu reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

O-(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-N-Fmoc-amfoterycyna B (61)

Wychodząc z 210 mg (0.18 mmola) Fmoc-AmB 4 otrzymano 220 mg (93%), $R_{\rm f}$ 0.48 (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m*/*z* obliczone dla C₆₉H₈₆N₄O₂₀: 1290.5835; znalezione 1289.5742 [M-1]⁻

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 8.40 (d, *J* = 7.5Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 6.8Hz, 1H), 7.80 (t, *J* = 7.9Hz, 1H), 7.60 (m, 3H), 7.50 (m, 1H), 7.40 (bt, 2H), 7.00 – 7.30 (m, 3H), 5.90 – 6.40 (m, 14H), 5.30 (bd, 1H) 5.20 (m, 1H), 4.10 – 4.40 (m, 4H), 3.00 – 3.90 (m, 10H), 1.40 – 2.60 (m, 18H), 1.20 – 2.40 (m, 17H), 1.10 (d, *J* = 6.4Hz, 3H), 1.00 (d, *J* = 6.4Hz, 3H), 0.90 (d, *J* = 8.3Hz, 3H).

O-(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-N-Fmoc-nystatyna A₁ (62)

Wychodząc z 200 mg (0.17 mmola) Fmoc-Nys 1 otrzymano 146 mg (65%) produktu. $R_f 0.46$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₆₉H₈₈N₄O₂₀: 1292.5992; znalezione 1291.6053 [M-1]⁻

¹H NMR (CD₃OD) δ [ppm]: 8.38 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.97 (s, 2H), 7.89 (m, 1H), 7.83 – 7.68 (m, 3H), 7.57 – 7.48 (m, 1H), 7.42 – 7.20 (m, 3H), 6.59 – 6.01 (m, 10H), 5.48 – 5.30 (m, 2H), 4.44 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 4.24 – 3.99 (m, 3H), 3.86 – 3.56 (m, 4H), 3.33 (m, 8H), 3.19 (m, 3H), 2.68 (m, 2H), 2.48 – 2.11 (m, 4H), 1.97-1.45(m, 7H), 1.42 – 1.30 (m, 10H), 1.20 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.12 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.03 (d, J = 7.2 Hz, 3H).

8.2. Koniugaty typu dwuścienny parasol molekularny/ωaminokwas/makrolid polienowy – procedura ogólna

Do roztworu 40.8 µmola estru aktywnego makrolidu polienowego w 0.5 ml bezwodnego DMF wkroplono roztwór 39.7 µmola 'parasola molekularnego' i 13 µl (97.5 µmola) TEA w 2 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 5 h w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 150 µl (1.5 µmola) piperydyny i kontynuowano mieszanie przez 15 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę poreakcyjną wkroplono do 55 ml eteru dietylowego. Wytrącony osad odsączono, a następnie oczyszczono przy pomocy PLC w układzie chloroform:metanol:woda (6.5:1:0.1 v/v).

N^3 -(N-amfoterycynoilo-3-aminopropanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilo-spermidyna (63)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-AmB **61** oraz 38 mg parasola kwasu *N*-(3-aminopropanoilo)deoksycholowego **55** otrzymano 16 mg (0.008 mmola, 20%) koniugatu **63**, $R_f 0.13$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla $C_{105}H_{171}N_5O_{23}$: 1870.2365; znalezione 1871.2412 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 27H), 3.9 (bs, 4H), 1.4 – 2.6 (m, 104H), 0.9 – 1.4 (m, 20H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(N-amfoterycynoilo-4-aminobutanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilo-spermidyna (64)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-AmB **61** oraz 39 mg parasola kwasu *N*-(4-aminobutanoilo)deoksycholowego **56** otrzymano 63 mg (0.03 mmola, 80%) koniugatu **64**, $R_f 0.13$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla $C_{106}H_{173}N_5O_{23}$: 1884.2521; znalezione 1885.2586 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 27H), 3.9 (bs, 4H), 2.9 (m, 2H) 1.4 – 2.6 (m, 104H), 0.9 – 1.4 (m, 20H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(N-amfoterycynoilo-6-aminoheksanoilo)- N^I , N^7 -di-deoksycholoilo-spermidyna (65)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-AmB **61** oraz 40 mg parasola kwasu *N*-(6-aminoheksanoilo)deoksycholowego **57** otrzymano 27 mg (0.01 mmola, 34%) koniugatu **65**, $R_f 0.13$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₀₈H₁₇₇N₅O₂₃: 1912.2834; znalezione 1913.2872 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 25H), 3.9 (bs, 4H), 1.4 – 2.6 (m, 105H), 1.0 – 1.4 (m, 20H), 0.9 (s, 6H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(N-amfoterycynoilo-8-aminooktanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilo-spermidyna (66)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-AmB **61** oraz 41 mg parasola kwasu *N*-(8-aminooktanoilo)deoksycholowego **59** otrzymano 43 mg (0.02 mmola, 54%) koniugatu **66**, $R_f 0.13$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla $C_{110}H_{181}N_5O_{23}$: 1940.3147; znalezione 1941.3156 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 32H), 3.9 (s, 2H), 3.8 (s, 2H), 0.9 – 2.4 (m, 123H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(*N*-nystatynoilo-3-aminopropanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilospermidyna (67)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-NYS **62** oraz 38 mg parasola kwasu *N*-(3-aminopropanoilo)deoksycholowego **55** otrzymano 10 mg (0.05 mmola, 13%) koniugatu **67**, $R_f 0.13$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₀₅H₁₇₃N₅O₂₃: 1872.2521; znalezione 1873.2529 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 5.2 – 6.2 (m, 12H), 3.0 – 4.6 (m, 29H), 2.0 – 2.8 (m, 18H), 0.9 – 2.0 (m, 114H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(N-nystatynoilo-4-aminobutanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilospermidyna (68)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-NYS **62** oraz 39 mg parasola kwasu *N*-(4-aminobutanoilo)deoksycholowego **56** otrzymano 58 mg (0.03 mmol, 73%) koniugatu **68**, $R_f 0.13$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₀₆H₁₇₅N₅O₂₃: 1886.2678; znalezione 1887.2696 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ: 5.2 – 6.2 (m, 12H), 3.0 – 4.6 (m, 29H), 2.0 – 2.8 (m, 20H), 0.9 – 2.0 (m, 114H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(N-nystatynoilo-6-aminoheksanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilospermidyna (69)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-NYS **62** oraz 40 mg parasola kwasu *N*-(6-aminoheksanoilo)deoksycholowego **57** otrzymano 21 mg (0.01 mmola, 27%) koniugatu **69**, R_f 0.13 (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₀₈H₁₇₉N₅O₂₃: 1914.2991; znalezione 1915.3059 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 5.2 – 6.2 (m, 12H), 3.0 – 4.6 (m, 25H), 3.9 (bs, 4H), 1.3 – 2.4 (m, 103H), 0.9 – 1.3 (m, 35H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(N-nystatynoilo-8-aminooktanoilo)- N^1 , N^7 -di-deoksycholoilospermidyna (70)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-NYS **62** oraz 41 mg parasola kwasu *N*-(8-aminooktanoilo)deoksycholowego **58** otrzymano 36 mg (0.02 mmola, 45%) koniugatu **70**, $R_f 0.13$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m*/*z* obliczone dla C₁₁₀H₁₈₃N₅O₂₃: 1942.3304; znalezione 1943.3346 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 5.2 – 6.2 (m, 12H), 2.9 – 4.6 (m, 37H), 1.2 – 2.6 (m, 96H), 1.2 – 0.8 (m, 34H) 0.7 (s, 6H).

N^3 -(N-amfoterycynoilo-4-aminobutanoilo)- N^1 , N^7 -di-choloilospermidyna (71)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-AmB **61** oraz 40 mg parasola kwasu *N*-(4-aminobutanoilo)cholowego **59** otrzymano 18 mg (0.009 mmola, 22%) koniugatu **71**, $R_f 0.13$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₀₆H₁₇₃N₅O₂₅: 1916.2420; znalezione 1917.2433 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 25H), 3.9 (s, 2H), 3.8 (s, 2H), 1.4 – 2.6 (m, 82H), 1.2 – 1.4 (m, 25H), 1.21 – 0.9 (m, 16H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(N-amfoterycynoilo-8-aminooktanoilo)- N^1 , N^7 -di-choloilospermidyna (72)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-AmB **61** oraz 42 mg parasola kwasu *N*-(8-aminooktanoilo)cholowego **60** otrzymano 32 mg (0.016 mmola, 40%) koniugatu **72** o R_f 0.13 (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₁₀H₁₈₁N₅O₂₅: 1973.3061; znalezione 1972.3046 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 25H), 3.9 (s, 2H), 3.8 (s, 2H), 1.4 – 2.6 (m, 90H), 1.2 – 1.4 (m, 25H), 1.21 – 0.9 (m, 16H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(N-nystatynoilo-4-aminobutanoilo)- N^1 , N^7 -di-choloilospermidyna (73)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-NYS **62** oraz 40 mg parasola kwasu *N*-(4-amino-butanoilo)cholowego **59** otrzymano 12 mg (0.006 mmola, 15%) koniugatu **73**, $R_f 0.13$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₀₆H₁₇₅N₅O₂₅: 1918.2576; znalezione 1919.2657 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 5.0-6.2 (m, 12H), 3.0-4.6 (m, 25H), 3.9 (s, 2H), 3.8 (s, 2H), 1.2-2.6 (m, 115H), 1.2-0.9 (m, 16H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(N-nystatynoilo-8-aminooktanoilo)- N^1 , N^7 -di-choloilospermidyna (74)

Wychodząc z 53 mg estru aktywnego TDBTU Fmoc-NYS **62** oraz 42 mg parasola kwasu *N*-(8-aminooktanoilo)cholowego **60** otrzymano 20 mg (0.01 mmola, 25%) koniugatu **74** o $R_f 0.13$ (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

HRMS-ESI: *m*/*z* obliczone dla C₁₁₀H₁₈₃N₅O₂₅: 1974.3202; znalezione 1975.3222 [M+1]⁺

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 1:3) δ [ppm]: 5.0 – 6.2 (m, 12H), 3.0 – 4.6 (m, 25H), 3.9 (s, 2H), 3.8 (s, 2H), 1.4 – 2.6 (m, 90H), 1.2 – 1.4 (m, 28H), 1.21 – 0.9 (m, 16H), 0.7 (s, 6H).

Summary

One of the biggest problems of modern medicine is the drastic increase of disseminated fungal infections in immunocompromised patients. Extensive use of broad spectrum antibacterial antibiotics, immunosuppressive drugs, anticancer and hormonal drugs generates niches for colonization by human pathogenic fungi and further development of disseminated mycoses, difficult to eliminate with existing antifungal drugs. An ideal antifungal agent should be characterized by: fungicidal action, broad spectrum of antifungal activity, low mammalian toxicity and ability to overcome the multi-drug resistance. None of the clinically available antifungal drugs meets all of these requirements. That is why there is a constant need for looking for novel drugs or improving properties of the existing ones. Polyene macrolide antifungal antibiotics, amphotericin B (AmB) and Nystatin A₁ (NYS), seem to be the good candidates for improving their selective toxicity by chemical modification.

In this study, possibilities of novel chemical modifications of the aminosugar part of AmB and NYS was tested. Conditions were optimized for a multistep preparation of the protected AmB aglycone containing free hydroxyl group at the C19 carbon atom which was used as a substrate for nucleophilic substitution and dehydrative glycosylation. Attempts focused on preparation of an analogous derivative of Nystatin A1 were not successful, due to the apparent instability of NYS under these conditions. Conditions for the synthesis of novel protected sugar derivatives and non-sugar compounds, as convenient substrates for the reaction with the protected AmB aglycone were determined. Compounds obtained included: 3-[(*N-tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-propyl methanesulfonate, *N-tert*-butoxycarbonyl-3-fluoroaniline, bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranose, 2,4,6-tri-O-(triethylosililo)-3-azido-3-deoxy-D-allopyranose, 2,4,6-tri-O-(triethylosililo)-3-azido-3-deoxy-D-glucopyranose, 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-gluco-pyranose, 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-glucopyranose and 3-azido-2,3,6-trideoxy-D-xylose. In reactions of the protected AmB aglycone with tetra-O-benzyl glucopyranose and 3-azido-2,3,6-trideoxy-D-xylose, two novel protected derivatives of AmB were obtained.

Conjugates of amphotericin B and nystatin A_1 with 'molecular umbrellas' composed of cholic and deoxycholic acid derivatives were constructed. The former but not the latter demonstrated improved selective toxicity in comparison to the mother antibiotics.

All the novel compounds obtained were characterized by ¹H and ¹³C NMR and mass spectrometry. Moreover, the identity of AmB conjugates with sugar derivatives was confirmed by the two-dimensional spectra HSQC and HMBC.

Bibliografia

- 1. E. Borowski, J. Zieliński, T. Zimiński, L. Falkowski, P. Kołodziejczyk, J. Golik, E. Jereczek. Chemical studies with amphotericin B. 3. The complete structure of the antibiotic. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *45*, 3909-3914.
- M. K. Kathiravan, A. B. Salake, A. S. Chothe, P. B. Dudhe, R. P. Watode, M. S. Mukta, S Gadhwe. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 5678-5698.
- 3. G. Garber. An Overview of Fungal Infections. *Drugs* **2001**, *61*, 1-12.
- 4. P. Vandeputte, S. Ferrari, A. T. Coste. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int. J. Microbiol.* **2012**, *2012*, 713687-713713.
- 5. A. Lupetti, R. Danesi, M. Campa, M. Del Tacca, S. Kelly. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, 76-81.
- 6. M. A. Ghannoum, L. B Rice. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 501-517.
- G. D. Brown, D. W. Denning, N. A. R. Gow, S. M. Levitz, M. G. Netea, T. C. White. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.* 2012, 4, 1-9.
- 8. J. W. Harman, J. G. Masterson. The mechanism of nystatin action. *Ir. J. Med. Sci.* **1957**, *32*, 249-253.
- 9. E. T. Stiller, J. Vandeputte, J. L. Watchtel. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. II. The isolation and properties of the crystalline amphotericins. *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 587-591.
- 10. E. L. Hazen, R. Brown. Two antifungal agents produced by a soil actinomycete. *Science*. **1950**, *112*, 93-97.
- L. S. Goodman, A. Gilman, J. G. Hardman, L. E. Limbird. Pharmacological basis of therapeutics Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. ed. J. G. Hardman, L. E. Limbird, McGraw-Hill, Health Professions Division; 1996, 1175-1190.
- 12. J. M. Hamilton-Miller. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *Bacteriol. Rev.* **1973**, *37*, 166-196.
- 13. J. Bolard. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1986**, 864, 257-3041.
- 14. S. D. Rychnovsky. Oxo Polyene Macrolide Antibiotics. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2021-2040.
- 15. S. M. Hammond. Progress in Medicinal Chemistry. Biological activity of polyene antibiotics. ed. G. P. Ellis, G. B. West, North-Holland Pub. Co; 1977, 105-179.
- 16. L. Vértesy. Proticin, a new phosphorus-containing antibiotic. II. Characterization and chemical studies. *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 4-10.

- G. Gimpl. Cholesterol-Protein Interaction: Methods and Cholesterol Reporter Molecules. Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins: Structure and Function in Health and Disease. ed. R. Harris, Springer Verlag; 2010, 35-37.
- E. Borowski, L. Falkowski, J. Golik, T. Zimiński, W. Mechliński, E. Jereczek, P. Kołodziejczyk. The structure of candidin, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *12*, 1987-1992.
- 19. M. von Saltza, J. D. Dutcher, J. Reid, O. Wintersteiner. Nystatin. IV. The Stereochemistry of Mycosamine. J. Org. Chem. **1963**, 28, 999-1004.
- 20. D. R. Walters, J. D. Dutcher, O.Wintersteiner. The structure of mycosamine. J. Am. Chem. Soc. 1957, 79, 5076-5077.
- 21. E. G. Brescansin, M. Portilho, F. B. T.Pessine. Physical and chemical analysis of commercial nystatin. *Acta Sci. Heal. Sci.* **2013**, *35*, 215-221.
- 22. D. G. Manwaring, R. W. Rickards. The structure of the aglycone of the macrolide antibiotic nystatin. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 5319-5322.
- 23. J. D. Dutcher, D. R. Walters, O. Wintersteiner. Nystatin. III. Mycosamine: Preparation and Determination of Structure. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 995-999.
- K. Szwarc, M. Płosiński, K. Czerniejewska, T. Laskowski, A. Leniak, J. Czub, P. Kubica, P. Sowiński, J. Pawlak, E. Borowski. Intramolecular transformation of an antifungal antibiotic nystatin A₁ into its isomer, *iso* nystatin A₁ structural and molecular modeling studies. *Magn. Reson. Chem.* 2016, *54*, 953-961.
- 25. B. Venegas, J. González-Damián, H. Celis, I. Ortega-Blake. Amphotericin B channels in the bacterial membrane: role of sterol and temperature. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2323-2332.
- D. S. Palacios, I. Dailey, D. M. Siebert, B. C. Wilcock, M. D. Burke. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011, *108*, 6733-6738.
- S. C. Hartsel, S. K. Benz, W. Ayenew, J. Bolard. Na⁺, K⁺ and Cl⁻ selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotericin B and other polyene antibiotics. *Eur. Biophys. J.* 1994, 23, 125-132.
- K. C. Gray, D. S. Palacios, I. Dailey, M. M. Endo, B. E. Uno, B. C. Wilcock, M. D. Burke. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012, *109*, 2234-2239.
- T. M. Anderson, M. C. Clay, A. G. Cioffi, K. A. Diaz, G. S. Hisao, M. D. Tuttle, A. J. Nieuwkoop, G. Comellas, M. Nashrah, S. Wang, B. E. Uno, E. L. Wildeman, T. Gonen, C. M. Rinestra, M. D. Burke. Amphotericin Forms an Extramembranous and Fungicidal Sterol Sponge. *Nat. Chem. Biol.* 2014, *10*, 400-406.
- 30. T. E. Andreoli. The structure and function of amphotericin B cholesterol pores in lipid bilayer membranes. *Ann. New York Acad. Sci.* **1974**, *235*, 448-468.

- 31. J. Mazerski, J. Grzybowska, E. Borowski. Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. *Eur. Biophys. J.* **1990**, *18*, 159-164.
- 32. P. Legrand, E. A. Romero, B. E. Cohen, J. Bolard. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2518-2522.
- A. Coutinho, L. Silva, A. Fedorov, M. Prieto. Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation. *Biophys. J.* 2004, 87, 3264-3276.
- 34. J. R. Rees, R. W. Pinner, R. A. Hajjeh, M. E. Brandt, A. L. Reingold. The Epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay area, 1992–1993: Results of population-based laboratory active surveillance. *Clin. Infect. Dis.* 1998, 27, 1138–1147
- 35. T. J. Walsh, P. F. Jarosinski, R. A. Fromtling. Increasing usage of systemic antifungal agents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **1990**, *13*, 37-40.
- 36. H. A. Gallis, R. H. Drew, W. W. Pickard. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Clin. Infect. Dis.* **1990**, *12*, 308-329.
- 37. F. Gutiérrez, P. G. Wall, J. Cohen. An audit of the use of antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *37*, 175-185.
- 38. M. M. Canuto, F. G. Rodero. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet. Infect. Dis.* **2002**, *2*, 550-563.
- 39. M. D. Martins, J. H. Rex. Resistance to antifungal agents in the critical care setting: problems and perspectives. *New Horiz.* **1996**, *4*, 338-344.
- 40. J. Pemán, E. Cantón, A. Espinel-Ingroff. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2009**, *7*, 453-460.
- 41. T. C. White, K. A. Marr, R. A Bowden. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 382-402.
- 42. M. A. Pfaller. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am. J. Med.* **2012**, *125*, S3-S13.
- 43. A. A. Volmer, A. M. Szpilman, E. M. Carreira. Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1329-1347.
- 44. C. P. Schaffner, E. Borowski. Biologically active *N*-acyl derivatives of polyene macrolide antifungal antibiotics. *Antibiot. Chemother.* **1961**, *11*, 724-732.
- 45. W. Mechliński, C. P. Schaffner. Polyene macrolide derivatives. I. J. *Antibiot.* **1972**, *25*, 256-258.
- 46. E. Borowski, C. P. Schaffner. Polyenic compounds and procedures related thereto. US 3244590A, 1966.
- 47. J. J. K. Wright, J. A. Albarella, D. Loebenberg. *N*-aminoacyl derivatives of polyene macrolide antibiotics and their esters. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 911-914.
- 48. A. Czerwiński, J. Grzybowska, E. Borowski. *N*-dimethylaminoacyl derivatives of polyene macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 1025-1027.

- E. Borowski, J. Grzybowska, M. Bontemps-Gracz, M. Ślisz, T. Zieniawa. Zawadzone przestrzennie amfoteryczne *N*-aminoacylowe pochodne amfoterycyny B, sposób ich otrzymywania i zastosowanie do wytwarzania leku do zwalczania drobnoustrojów grzybowych. PL 210774, 2012.
- 50. A. Czerwiński, W. A. Konig, T. Zieniawa, P. Sowiński, V. Sinnwell, S. Milewski, E. Borowski, New *N*-alkyl derivatives of amphotericin B synthesis and biological properties. *J. Anibiot.* **1991**, *44*, 979-984.
- K. Takatori, T. Hasegawa, S. Nakano, J. Kitamura, N. Kato. Antifungal activities of *N*-substituted maleimide derivatives. *Microbiol. Immunol.* 1985, 29, 1237-1241.
- V. Paquet, E. M. Carreira. Significant improvement of antifungal activity of polyene macrolides by bisalkylation of the mycosamine. *Org. Lett.* 2006, *8*, 1807-1809.
- 53. V. V. Belakhov, Y. D. Shenin. Synthesis and antifungal activity of *N*-benzyl derivatives of amphotericin B. *Pharm. Chem. J.* **2007**, *41*, 362-366.
- 54. L. Falkowski, J. Golik, P. Kołodziejczyk, J. Pawlak, J. Zieliński. *N*-glycosyl derivatives of polyene macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **1975**, 28, 244-245.
- 55. L. Falkowski, Z. Kowszyk-Gindifer, Z. Płóciennik, J. Zieliński, H. Dahlig, J. Golik, P. Kolodziejczyk, E. Jakobs, E. Bylec, D. Roślik-Kamińska, W. Wagner, J. Pawlak, E. Borowski. Salts of *N*-glycosyl derivatives of poluene macrolides, especially *N*-methylglucamine salts as well as the method of their preparation.US 4195172, 1980.
- 56. J. Szlinder-Richert, J. Mazerski, B. Cybulska, J. Grzybowska, E. Borowski. *N*-methyl-*N*-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, a new amphotericin B derivative of low toxicity: relationship between self-association and effects on red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2001**, *1528*, 15-24.
- V. Paquet, A. A. Volmer, E. M. Carreira. Synthesis and *in vitro* biological properties of novel cationic derivatives of Amphotericin B. *Chem. Eur. J.* 2008, *14*, 2465-2481.
- 58. R. Falk, A. J. Domb, I. Polacheck. A novel injectable water-soluble amphotericin B-arabinogalactan conjugate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1975-1981.
- T. Ehrenfreund-Kleinman, T. Azzam, R. Falk, I. Polacheck, J. Golenser, A. Domb. Synthesis and characterization of novel water soluble amphotericin B–arabinogalactan conjugates. *Biomaterials* 2002, 23, 1327-1335.
- 60. T. Ehrenfreund-Kleinman, J. Golenser, A. J. Domb. Conjugation of amino-containing drugs to polysaccharides by tosylation: amphotericin B– arabinogalactan conjugates. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3049-3057.
- 61. T. Bruzzese, M. Cambieri, F. Recusani. Synthesis and biological properties of alkyl esters of polyene antibiotics. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 462-463.

- 62. R. C. Padney, Jr. K. L. Rinehart. Polyene antibiotics. IX. An improved method for the preparation of methyl esters of polyene antibiotics. *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 158-162.
- 63. C. P. Schaffner, W. Mechliński. Polyene macrolide derivatives. II Physical-chemical properties of polyene macrolide esters and their soluble salts. *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 259-260.
- 64. C. P. Schaffner, W. Mechliński. Derivatives of polyene macrolide antibiotics. US 3945993A, 1976.
- 65. C. P. Schaffner, W. Mechliński. Derivatives of polyene macrolide antibiotics. US 4035568A, 1977.
- 66. L. Falkowski, A. Jarzębski, B. Stefańska, E. Bylec, E. Borowski. The synthesis of amides of polyene macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 103-104.
- 67. A. Jarzębski, L. Falkowski, E. Borowski. Synthesis and structure activity relationships of amides of amphotericin B. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 220-229.
- H. Resat, F. A. Sungur, M. Bagiński, E. Borowski, V. Aviyente. Conformational properties of amphotericin B amide derivatives – impact on selective toxicity. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 2000, *14*, 689-703.
- S. A. Davis, B. M. Vincent, M. M. Endo, L. Whitesell, K. Marchillo, D. R. Andes, S. Lindquist, M. D. Burke, Nontoxic antimicrobials that evade drug resistance. *Nat. Chem. Biol.* 2015, *11*, 481-487.
- 70. J. Grzybowska, E. Borowski. Hydrazides a novel type of derivatives of polyene macrolide antifungal antibiotics. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 907-908.
- A. Czerwiński, W. A. Konig, P. Sowiński, L. Falkowski, J. Mazerski, E. Borowski. Amphotericin B *O*-methyl oxime Synthesis and biological properties. *J. Antibiot.* 1990, 43, 1098-1100.
- 72. R. M. Kennedy, A. Abiko, S. Masamune. Degradation of amphotericin B: Cleavage of the glycosidic linkage with aluminum amalgam [Al(Hg)] of dichlorodicyanoquinone (DDQ). *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 447-450.
- M. J. Driver, W. S. MacLachlan, D. T. MacPherson, S. A. Readshaw, C. McNeal, G. T. Furst. The chemistry of amphotericin B. Synthesis of 13,14-anhydro derivatives. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1990, 53, 636.
- 74. A. W. Taylor, D. T. MacPherson. Preparation of a Novel C-13 Thioacetal Derivative of Amphotericin B. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5289-5292.
- A. W. Taylor, B. J. Costello, P. A. Hunter, W. S. Maclachlan, C. T. Shanks. Synthesis and antifungal selectivity of new derivatives of amphotericin B modified at the C-13 position. *J. Antibiot.* 1993, *46*, 486-493.
- 76. N. Matsumori, Y. Umegawa, T. Oishi, M. Murata. Bioactive fluorinated derivative of amphotericin B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3565-3567.
- 77. W. S. MacLachlan. Amphotericin derivatives. US 6284736, 2001.
- M. J. Driver, A. R. Greenlees, W. S. MacLachlan, D. T. MacPherson, A. W. Taylor. Synthesis of 16-decarboxy-16-hydroxymethyl amphotericin B a novel antifungal agent. *Tetrahedron Lett.* 1992, *33*, 4357-4360.

- M. J. Driver, A. R. Greenlees, D. T. MacPherson, H. Takei, Y. Ogawa, N. S. Simpkins. A versatile strategy for the derivatisation of the carboxy group of amphotericin B: the preparation of C-16 ketone analogues. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1. 1992, 95, 3155-3157.
- 80. M. Endo, A. Cioffi, M. Burke. Our path to less toxic Amphotericins. *Synlett.* **2015**, *27*, 337-354.
- S. A. Davis, B. M. Vincent, M. M. Endo, L. Whitesell, K. Marchillo, D. R. Andes, S. Lindquist, M. D. Burke. Nontoxic antimicrobials that evade drug resistance. *Nat. Chem. Biol.* 2015, *11*, 481-487.
- 82. D. S. Palacios, T. M. Anderson, M. D. Burke. A Post-PKS oxidation of the Amphotericin B skeleton predicted to be critical for channel formation is not required for potent antifungal activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13804-13805.
- B. C. Wilcock, M. M. Endo, B. E. Uno, M. D. Burke. C2'-OH of Amphotericin B plays an important role in binding the primary sterol of human cells but not yeast cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, *135*, 8488-8491.
- 84. M. D Burke. Antifungal polyene macrolide derivatives with reduced mammalian toxicity. WO/2016/014779, 2016.
- 85. M. D. Burke, B. E. Uno, S. Rakshit. Scalable synthesis of reduced toxicity derivative of amphotericin B. WO/2016/061437, 2016.
- M. Sedlák, V. Buchta, L. Kubicová, P. Šimunek, M. Holčapek, P. Kašparová Synthesis and characterisation of a new amphotericin B–methoxypoly(ethylene glycol) conjugate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, *11*, 2833-2835.
- C. D. Conover, H. Zhao, C. B. Longley, K. L. Shum, R. B. Greenwald. Utility of poly(ethylene glycol) conjugation to create prodrugs of Amphotericin B. *Bioconjug. Chem.* 2003, 14, 661-666.
- N Matsumori, N Eiraku, S Matsuoka, T. Oishi, M. Murata, T. Aoki, T. Ide. An Amphotericin B ergosterol covalent conjugate with powerful membrane permeabilizing activity. *Chem. Biol.* 2004, *11*, 673-679.
- S. Matsuoka, N. Matsumori, M. Murata, K. Neil, C. W. M. Grant. Amphotericin B – phospholipid covalent conjugates: dependence of membrane-permeabilizing activity on acyl-chain length. *Org. Biomol. Chem.* 2003, 1, 3882-3884.
- 90. N. Yamaji, N. Matsumori, S. Matsuoka, T. Oishi, M. Murata. Amphotericin B dimers with bisamide linkage bearing powerful membrane-permeabilizing activity.*Org. Lett.* **2002**, *4*, 2087-2089.
- 91. N. Yamaji, N. Matsumori, S. Matsuoka, T. Oishi, M. Murata. Amphotericin B Covalent Dimers Forming Sterol-Dependent Ion-Permeable Membrane Channels. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4180-4181.
- 92. N. Matsumori, R. Masuda, M. Murata. Amphotericin B Covalent Dimers Bearing a Tartarate Linkage. *Chem Biodivers*. **2004**, *1*, 346-352.

- A. Zumbuehl, P. Stano, M. Sohrmann, M. Peter, P. Walde, P. Walde, D. Jeannerat, E. M. Carreira. A novel strategy for bioconjugation: synthesis and preliminary evaluation with amphotericin B. *Org. Biomol. Chem.* 2007, *5*, 1339.
- A. Zumbuehl, P. Stano, M. Sohrmann, R. Dietiker, M. Peter, P. Walde, E. M. Carreira. Synthesis and Investigation of Tryptophan–Amphotericin B Conjugates. *Chem. BioChem.* 2009, *10*, 1617-1620.
- 95. W. Wu, S. Więckowski, G. Pastorin, M. Benincasa, C. Klumpp, J.-P. Briand, R. Gennaro, M. Prato, A. Bianco. Targeted delivery of Amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6358-6362.
- V. Janout, C. Bienvenu, W. Schell, J. R. Perfect, S. L. Regen. Molecular Umbrella – Amphotericin B conjugates. *Bioconjug. Chem.* 2014, 25, 1408-1411.
- L. L. Cline, V. Janout, M. Fisher, R. L. Juliano, S. L. Regen. A molecular umbrella approach to the intracellular delivery of small interfering RNA. *Bioconjug. Chem.* 2011, 22, 2210-2216.
- K. C. Nicolaou, R. A. Daines, Y. Ogawa, T. K. Chakraborty. Total synthesis of amphotericin B. 3. The final stages. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, *110*, 4696-4705.
- 99. K. C. Nicolaou, R. A. Daines, T. K. Chakraborty, Y. Ogawa. Total synthesis of amphoteronolide B and amphotericin B. 2. Total synthesis of amphoteronolide B. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4685-4696.
- 100. K. C. Nicolaou, R. A. Daines, J. Uenishi, W. S. Li, D. P. Papahatjis, T. K. Chakraborty. Total synthesis of amphoteronolide B and amphotericin B.
 1. Strategy and stereocontrolled construction of key building blocks. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4672-4685.
- 101. K. C. Nicolaou, R. A. Daines, T. K. Chakraborty, Y. Ogawa. Total synthesis of amphotericin B. J. Am. Chem. Soc. **1987**, 109, 2821-2822.
- 102. G. J. McGarvey, J. A. Mathys, K. J. Wilson. Synthesis of Amphotericin B. A convergent strategy to the polyol segment of the heptaene macrolide antibiotics. J. Org. Chem. 1996, 61, 5704-5705.
- 103. H. Tsuchikawa, N. Matsushita, N. Matsumori, M. Murata, T. Oishi. Synthesis of 28-19F-amphotericin B methyl ester. *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 6187-6191.
- 104. A. M. Szpilman, D. M. Cereghetti, J. M. Manthorpe, N. R. Wurtz, E. M. Carreira. Synthesis and biophysical studies on 35-deoxy amphotericin B methyl ester. *Chem. Eur. J.* 2009, 15, 7117-7128.
- 105. J. Li, A. S. Grillo, M. D. Burke. From synthesis to function via iterative assembly of *N* -methyliminodiacetic acid boronate building blocks. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2297-2307.
- 106. E. M. Woerly, J. R. Struble, N. Palyam, S. P. O'Hara, M. D. Burke. (Z)-(2-Bromovinyl)-MIDA boronate: a readily accessible and highly versatile building block for small molecule synthesis. *Tetrahedron*. 2011, 67, 4333-4343.

- 107. D. M. Knapp, E. P. Gillis, M. D. Burke. A General Solution for Unstable Boronic Acids: Slow-Release Cross-Coupling from Air-Stable MIDA Boronates. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 6961-6963.
- 108. N. Salewska. "Synteza i charakterystyka *N*-podstawionych pochodnych antybiotyków przeciwgrzybowych z grupy makrolidów polienowych." Politechnika Gdańska, 2012.
- 109. K. Szwarc, M. Płosiński, K. Czerniejewska, T. Laskowski, A. Leniak, J. Czub, P. Kubica, P. Sowiński, J. Pawlak, E. Borowski, Intramolecular transformation of an antifungal antibiotic nystatin A₁ into its isomer, *iso* nystatin A₁ structural and molecular modeling studies. *Magn. Reson. Chem.* 2016, *54*, 953-961.
- 110. A. Oku, M. Kinugasa, T.Kamada Deprotection of Acetals and Silyl Ethers by DDQ. Is DDQ a Neutral Catalyst? *Chem. Lett.* **1993**, *22*, 165-168.
- 111. K. Tanemura, T. Suzuki, T. Horaguchi. 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-pbenzoquinone as a mild and efficient catalyst for the deprotection of acetals. J. Chem. Soc. Chem. Commun. **1992**, *14*, 979.
- 112. E. Lee-Ruff, F. J. Ablenas. Oxidation of allyl and benzyl ethers by 2,3dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ). *Can. J. Chem.* **1989**, 67, 699-702
- R. V.Stick, S. J. Williams Carbohydrates: the essential Molecules of Life. Chapter 4. Formation of the Glycosidic Linkage. ed. E. Fisher, Elsevier, 2009, 133-202.
- 114. P. J. Garegg, P. Konradsson, I. Kvarnstrom, T. Norberg, S. C. T. Svensson, B. Wigilius. Studies on Koenigs-Knorr Glycosidation. *Acta Chem. Scand.* 1985, *39*, 569-577.
- 115. K. Igarashi. The Koenigs-Knorr Reaction. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1977, 34, 243-283.
- 116. P. G. Scheurer, F.Smith. Synthesis of Acetobromo Sugars. J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 3224-3224.
- E. Kaya, F. Sonmez, M. Kucukislamoglu, M. Nebioglu. Selective anomeric deacetylation using zinc acetate as catalyst. *Chem. Pap.* 2012, 66, 312-315.
- 118. B. A. Garcia, D. Y. Gin. Dehydrative glycosylation with activated diphenyl sulfonium reagents. Scope, mode of C(1)-hemiacetal activation, and detection of reactive glycosyl intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4269-4279.
- 119. J. Jarý, Z. Kefurtová, J. Kovář. Amino sugars. XX. Synthesis of 3-aminoand 6-amino-deoxyhexoses of the gluco and allo configuration. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1969**, *34*, 1452-1458.
- 120. B. Furman, R. Łysek, Ł. Matyjasek, W. Wojtkielewicz, M. Chmielewski. Synthesis of solid-phase bound sulfonate esters. *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 2795-2802.
- M. Kloosterman, M. P. De Nijs, J. H. Van Boom. Synthesis of 1,6anhydro-2-O-trifluoromethanesulphonyl-α-D-mannopyranose Derivatives and their conversion into the corresponding 1.6-anhydro-2-azido-2-deoxyβ-D-glucopyranoses: A convenient and efficient approach. *J. Carbohydr. Chem.* **1986**, *5*, 215-233.
- 122. J. M. Denu. *O*-Acetyl-ADP-ribose non-hydrolyzable analogs. US 20070225246 A1, 2007.
- 123. S. Hanessian, J.-M. Vatèle. Design and reactivity of organic functional groups: imidazolylsulfonate (imidazylate) au efficient and versatile leaving group. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3579-3582.
- 124. E. Fischer, K. Zach. Neue Synthese von basen der zuckergruppe. *Chem. Ber.* **1911**, *44*, 132-135.
- S. Hanessian, N. R. Plessas. Reaction of O-benzylidene sugars with *N*bromosuccinimide. II. Scope and synthetic utility in the methyl 4,6-Obenzylidenehexopyranoside series. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1035-1044.
- 126. K. Tokuyama. Sorboses. V. The Reactions of the tosyloxy groups of 2,3-*O*-isopropylidene-α-L-sorbofuranoses in liquid ammonia. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1964**, *37*, 1133-1137.
- 127. M. L. Wolfrom, J. Bernsmann, D. Horton. Synthesis of amino sugars by reduction of hydrazine derivatives. 5-Amino-3,6-anhydro-5-deoxy-L-idose Derivatives. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 4505-4509.
- M. L. Wolfrom, F. Shafizadeh, R. K. Armstrong, T. M. S. Han. Synthesis of amino sugars by reduction of hydrazine derivatives; D- and Lribosamine, D-lyxosamine. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 3716-3719.
- P. Teodorović, R. Slättegård, S. Oscarson. Improved synthesis of 1,3,4,6tetra-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-α-D-mannopyranose. *Carbohydr. Res.* 2005, *340*, 2675-2676.
- 130. C. L. Stevens, R. P. Glinski, K. G. Taylor, F. Sirokman Rearrangement reactions of hexose 4-O-sulfonates in the presence of azide and phthalimide nucleophiles. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 592-596.
- 131. J. Alais, S. David. A precursor to the beta-pyranosides of 3-amino-3,6dideoxy-D-mannose (mycosamine). *Carbohydr. Res.* **1992**, *230*, 79-87.
- 132. S. C. Hung, C. C. Wang, S. W. Chang, C. S Chen. 1,6-Anhydro-β-lhexopyranoses as valuable building blocks toward the synthesis of lgulosamine and l-altrose derivatives. *Tetrahedron Lett.* 2001, *42*, 1321-1324.
- 133. S. Koto, N. Kawakatsu, S. Zen. The Synthesis of 3-Amino-3-deoxy-Dallose and related substances. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46*, 876-880.
- 134. S. Anjum, N. D. Vetter, J. E. Rubin, D. R. J. Palmer. Synthesis of 3,3'neotrehalosadiamine and related 1,1'-aminodisaccharides using disarmed, armed, and superarmed building blocks. *Tetrahedron.* **2013**, *69*, 816-825.
- 135. T. Muhizi, S. Grelier, V. Coma. Synthesis and antibacterial activity of aminodeoxyglucose derivatives against *Listeria innocua* and *Salmonella typhimurium. J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8770-8775.
- 136. W. N. Haworth, W. H. G. Lake, S. Peat. 59. The configuration of glucosamine (chitosamine). J. Chem. Soc. **1939**, 271-274.

- 137. S. P. James, F. Smith, M. Stacy, L. F. Wiggins. A Constitutional synthesis of chondrosamine. *Nature*. **1945**, *156*, 308-309.
- 138. C. L. Stevens, R. P. Glinski, K. G. Taylor, P. Blumbergs, S. K. Gupta. The synthesis and proof of structure of perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-D-mannose) derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3160-3168.
- 139. C. L. Stevens, S. K. Gupta, R. P. Glinski, K.G.Taylor, P. Blumbergs, C. P. Schaffner, C.-H. Lee, Proof of structure, stereochemistry, and synthesis of perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-D-mannose) derivatives. *Carbohydr. Res.* 1968, 7, 502-504.
- J. Kovář, J. Jarý. Amino sugars. XV. Synthesis of derivatives of 3,6diamino-3,6-dideoxy-L-talose. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1968, 33, 549-555.
- 141. R. W. Jeanloz, Z. Tarasiejska-Glazer, D. A. Jeanloz. 2-Amino-2-deoxy-Didose (D-Idosamine) and 2-Amino-2-deoxy-D-talose (D-Talosamine). *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 532-536.
- J. G. Buchanan, K. J. Miller. 677. The action of ammonia on methyl 2,3anhydro-4,6-O-benzylidene-α-D-guloside and -taloside. *J. Chem. Soc.* **1960**, 3392-3394.
- 143. L.F. Wiggins. 143. The conversion of galactose into derivatives of Didose. J. Chem. Soc. **1944**, 522.
- 144. G. Charalambous, E. Percival. Products from the alkaline and reductive fission of the epoxide ring of methyl 3:4- and 2:3-anhydro-6-deoxy-α-L-taloside and of their methylated derivatives. *J. Chem. Soc.* **1954**, 2443-2448.
- T. Trnka M. Ceryny, M. Budesinsky, J. Pacak. Synthesis with anhydro sugars part 25. The synthesis of 3-amino-3-deoxy-D-glucose (kanosamine) and its 1,6-anhydro derivative. Conformation of amino derivatives of 1,6-anhydro-BETA-D-heksopyranoses. *Chem. Inform.* 1975, 6, 3038-3045.
- 146. W. H. Myers, G. J. Robertson. The Synthesis of amino sugars. I. J. Am. Chem. Soc. **1943**, 65, 8-11.
- M. H. Davidson, F. E. McDonald. Stereoselective synthesis of Ddesosamine and related glycals via Tungsten-Catalyzed alkynol cycloisomerization. *Org. Lett.* 2004, *6*, 1601-1603.
- 148. B. Koo, F. E. McDonald. Fischer carbene catalysis of alkynol cycloisomerization: application to the synthesis of the Altromycin B disaccharide. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1737-1740.
- 149. K. A. Parker, W. Chang. A Synthesis of L-vancosamine derivatives from non-carbohydrate precursors by a short sequence Based on the Marshall, McDonald, and Du Bois Reactions. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3891-3893.
- 150. K. A. Parker, W. Chang. Regioselectivity of rhodium nitrene insertion. Syntheses of protected glycals of L-daunosamine, D-saccharosamine, and L-ristosamine. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1785-1788.

- 151. M. T. Mendlik, P. Tao, C. M. Hadad, R. S. Coleman, T. L. Lowary. Synthesis of L-daunosamine and L-ristosamine glycosides via photoinduced aziridination. conversion to thioglycosides for use in glycosylation reactions. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8059-8070.
- 152. B. Renneberg, Y. M. Li, H. Laatsch, H. H. Fiebig. A short and efficient transformation of rhamnose into activated daunosamine, acosamine, ristosamine and epi-daunosamine derivatives, and synthesis of an anthracycline antibiotic acosaminyl-epsilon-iso-rhodomycinone. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 861-872.
- 153. J.-C. Florent, C. Monneret. Stereocontrolled route to 3-amino-2,3,6trideoxy-hexopyranoses. K-10 Montmorillonite as a glycosidation reagent for acosaminide synthesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 1171-1172.
- 154. H. H. Baer, T. Neilson. A new synthesis of 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose. J. Org. Chem. 1967, 32, 1068-1072.
- 155. N. V. Bovin, S. É. Zurabyan, A. Y. Khorlin. Addition of halogenoazides to glycals. *Carbohydr. Res.* **1981**, *98*, 25-35.
- 156. S. Mirabella, F. Cardona, A. Goti. Osmium-Catalyzed tethered aminohydroxylation of glycals: a stereodirected access to 2- and 3- aminosugars. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 728-731.
- 157. T. J. Donohoe, C. K. A. Callens, A. Flores, A. R. Lacy, A. H. Rathi. Recent developments in methodology for the direct oxyamination of olefins. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 58-76.
- 158. E. Levites-Agababa, E. Menhaji, L. N. Perlson, C. M. Rojas. Amidoglycosylation via metal-catalyzed internal nitrogen atom delivery. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 863-865.
- 159. C. Kan, C. M. Long, M. Paul, C. M. Ring, S. E. Tully, C. M. Rojas. Photo amidoglycosylation of an allal azidoformate. Synthesis of β-2-amido allopyranosides. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 381-384.
- 160. F. M. Hauser, S. R. Ellenberger, J. P. Glusker, C. J. Smart, H. L. Carrell. Stereoselective syntheses of (±)-daunosamine, (±)-vancosamine, and (±)ristosamine from acyclic precursors. J. Org. Chem. 1986, 51, 50-57.
- 161. J. Jurczak, J. Kozak, A. Gołębiowski. The total synthesis of Ldaunosamine. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4231-4238.
- 162. L. Miesch, T. Welsch, L. Toupet. Stereoselective synthesis of 3-amino-3deoxy-aldohexoses by aldol Condensation of Tricarbonyliron-αaminodienone complexes: total synthesis of multiprotected kanosamine. *Synthesis* **2011**, 2011, 161-167.
- 163. A. B. Northrup, D. W. MacMillan. Two-Step synthesis of carbohydrates by selective aldol reactions. *Science* **2004**, *305*, 1752-1755164.
- 164. T. Hiyama, K. Nishide, K. Kobayashi. A new synthesis of *N*-benzoyl-L-acosamine. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 569-572.
- N. K. Kolla, U. K. Neelam, S. R. Baddam, S. Gangula. Preparation of decitabine. US 20120046457A1, 2012.
- 166. R. M. Soll, S. P. Seitz. Synthetic studies on boron containing antibiotics. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5457-5460.

- 167. D. Koth, A. Fiedler, S. Scholz, M. Gottschaldt. Synthesis of different 3,5diazidofuranoses: A new and general synthesis pathway. *J. Carbohydr. Chem.* **2007**, *26*, 267-278.
- 168. M. Barbier, E. Grand, J. Kovensky. Allyl deprotection of galacturonic acid derivatives: mechanistic aspects of mercuric-catalyzed prop-1-enyl acetal cleavage. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2635-2640.
- K. Onodera, S. Hirano, N. Kashimura. Oxidation of carbohydrates with dimethyl sulfoxide containing phosphorus pentoxide. *J. Am. Chem. Soc.* 1965, 87, 4651-4652.
- 170. W. M. zu Reckendorf. A Simple Synthesis of 3-Amino-3-deoxy-D-glucose (Kanosamine). *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, *5*, 967-967.
- 171. J. S. Brimacombe, J. G. H. Bryan, A. Husain, M. Stacey, M. S. Tolley. The oxidation of some carbohydrate derivatives, using acid anhydridemethyl sulphoxide mixtures and the pfitzner-moffatt reagent. Facile synthesis of 3-acetamido-3-deoxy-D-glucose and 3-amino-3-deoxy-Dxylose. *Carbohydr. Res.* **1967**, *3*, 318-324.
- 172. R. Rai, I. McAlexander, C.-W. T. Chang. Synthetic glycodiversification from aminosugars to aminoglycoside antibiotics. A review. *Org. Prep. Proc. Int.* **2005**, *37*, 337-375.
- 173. B. Fraser-Reid, U. E. Udodong, Z. Wu, H. Ottosson, J. R. Merritt, C. S. Rao, C. Roberts, R. Madsen. *n* -Pentenyl glycosides in organic chemistry: a contemporary example of serendipity. *Synlett.* **1992**, *12*, 927-942.
- 174. B. Helferich, W. Schäfer, α-Methyl-D-glucoside. Org. Synth. 1926, 6, 64
- 175. S. Pearson, W. Scarano, M. H. Stenzel. Micelles based on goldglycopolymer complexes as new chemotherapy drug delivery agents. *Chem. Commun.* 2012, *48*, 4695-4697.
- 176. A. I. Vogel, A. R. Tatchell, B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry. ed. B. S. Furniss, Longman Scientific & Technical, 1989, 644-645.
- 177. O. T. Schmidt, T. Auer, H. Schmadel. 2,3,4,6-Tetra-benzyl-α-D-glucose. *Chem. Ber.* **1960**, *93*, 556-557.
- A. I. Vogel. A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis., ed. A. R. Tatchell, Longmans, Green and Co., 1956, 465-465
- 179. S. Milewski, A. Janiak, M. Wojciechowski. Structural analogues of reactive intermediates as inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase and phosphoglucose isomerase. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *450*, 39–49.
- 180. A. Melcer, I. Łącka, I. Gabriel, M. Wojciechowski, B. Liberek, A. Wiśniewski, S. Milewski. Rational design of *N*-alkyl derivatives of 2-amino-2-deoxy-D-glucitol-6P as antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 6602-6606.
- 181. A. M. Janiak, M. Hoffmann, M. J. Milewska, S. Milewski. Hydrophobic derivatives of 2-amino-2-deoxy-D-glucitol-6-phosphate: a new type of D-glucosamine-6-phosphate synthase inhibitors with antifungal action. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 1653–1662.

- 182. R. A. Galemmo, D. Horton. Preparative routes to methyl 2-acetamido-2,6dideoxy-α-D-glucopyranoside. *Carbohydr. Res.* **1983**, *119*, 231–240.
- 183. K. Skarbek, I. Gabriel, P. Szweda, M. Wojciechowski, M. A. Khan, B. Görke, S. Milewski, M. J. Milewska. Synthesis and antimicrobial activity of 6-sulfo-6-deoxy-D-glucosamine and its derivatives. *Carbohydr. Res.* 2017, 448, 79–87.
- 184. Y. Okahata, R. Ando, T. Kunitake. 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.* **1979**, *52*, 3647-3653.
- 185. V. Janout, W. A. Schell, D. Thévenin, Y. Yu, J. R. Perfect, S. L. Regen. Taming Amphotericin B. *Bioconjug. Chem.* 2015, 26, 2021-2024.
- 186. A. S. Skwarecki, K. Skarbek, D. Martynow, M. Serocki, I. Bylińska, M. J. Milewska, S. Milewski. Molecular umbrellas modulate the selective toxicity of polyene macrolide antifungals. *Bioconjug. Chem.* 2018, 29, 1454-1465.

Dorobek naukowy

Publikacje w czasopismach z listy JCR:

A. Skwarecki, **K. Skarbek**, D. Martynow, M. Serocki, I. Bylińska, M. J. Milewska, S. Milewski. Molecular Umbrellas Modulate the Selective Toxicity of Polyene Macrolide Antifungals. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 1454-1465 (IF 4.485; Q1)

K. Skarbek, I. Gabriel, P. Szweda, M. Wojciechowski, M. A. Khan, B. Görke, S. Milewski, M. J. Milewska. Synthesis and antimicrobial activity of 6-sulfo-6deoxy-D-glucosamine and its derivatives. *Carbohydr. Res.* **2017**, *448*, 79-87 (IF 2.074; Q2)

K. Skarbek, M. J. Milewska. Biosynthetic and synthetic access to amino sugars. *Carbohydr. Res.* **2016**, *434*, 44-71 (IF 2.074; Q2)

Konferencje naukowe: Prezentacje ustne

K. Skarbek, Synthesis of 2-amino-2,6-dideoxy-D-glucitol-6-sulfonic acid as a potential antifungal agent. BioTech Conference 2013, Gdańsk

Artykuły pokonferencyjne

K. Skarbek. Synthesis of 2-amino-2,6-dideoxy-D-glucitol-6-sulfonic acid as a potential antifungal agent. *PhD Interdisciplinary Journal* **2013**, 2, 89-92

Sesje posterowe

A. S. Skwarecki, K. Skarbek, D. Martynow, M. Serocki, S. Milewski,
M. J. Milewska. Molecular umbrellas modulate the selective toxicity of polyene macrolide antifungals, SMYTE: 35th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics, Gurgaon, India, 2017, P-11, 65

K. Skarbek, I. Gabriel, P. Szweda, M. Wojciechowski, M. J. Milewska. Synthesis and antimicrobial activity of 6-sulfonyl analogues of D-glucosamine, 17th Tetrahedron Symposium, Sitges, Spain, 2016, P2.014

A. Skwarecki, **K. Skarbek**, D. Koperkiewicz, M. J. Milewska. Koniugaty parasoli molekularnych z makrolidami polienowymi. 59 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Poznań, 2016, S01, P17.83.

K. Skarbek, P. Szweda, M. J. Milewska. Synteza i właściwości pochodnych sulfo-D-glukozaminy, 58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Gdańsk, 2015, S03, P150.

K. Skarbek, P. Graban, M. J. Milewska. Synteza 6-deoksykanozaminy. 58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Gdańsk, 2015, M01, P02.