

Autor rozprawy doktorskiej:

Dorota Pawlak

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Nowe estrowe i amidowe pochodne
inhibitorów syntazy glukozamino-6-
fosforanu - synteza i aktywność
biologiczna

[Tytuł dokumentu]

[PODTYTUŁ DOKUMENTU]

DOROTAPAWLAK20@LIVE.COM

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi **Panu prof. dr hab. inż. Ryszardowi Andruszkiewiczowi** za opiekę, cenne wskazówki i pomoc merytoryczną udzieloną w trakcie powstawania niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję także **Pracownikom, Koleżankom i Kolegom** z Katedry Technologii Leków i Biochemii za życzliwą atmosferę i współpracę.*

SPIS TREŚCI

1.	Wstęp.....	4
2.	Wykaz stosowanych skrótów	5
3.	Część teoretyczna	6
3.1.	Infekcje grzybicze	6
3.2.	Terapia grzybic układowych.....	8
3.3.	Cele molekularne w terapii grzybic układowych	8
4.	Cel i zakres badań	26
5.	Wyniki i ich dyskusja.....	27
5.1.	Projektowanie nowych inhibitorów.....	27
5.2.	Syntezy inhibitorów FMDP i BADP	29
5.3.	Synteza amidów FMDP i BADP oraz określenie ich aktywności biologicznej.	29
5.4.	Syntezy pochodnych estrowych FMDP i BADP oraz określenie ich aktywności biologicznej.....	40
5.5.	Syntezy koniugatów FMDP i BADP z hydroksyamidami oraz ich właściwości biologiczne.	49
5.6.	Syntezy koniugatów FMDP z glicynamidami i L-alaninamidami oraz badania aktywności biologicznej.....	55
6.	Podsumowanie i wnioski	61
7.	Część eksperymentalna	64
7.1.	Informacje ogólne	64
7.2.	Otrzymywanie kwasu N ² -tert-butoksykarbonylo-N ³ -(4-metoksyfumaroylo)- S-2,3-diaminopropanowego (BocFMDP).....	65
7.3.	Otrzymywanie amidów kwasu N ³ -(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3- diaminopropanowego (FMDP).	67
7.4.	Otrzymywanie kwasu N ² -tert-butoksykarbonylo-(S)-N ³ -[(E)-4-fenyl-4- oksobutenoylo]diaminopropanowego (BocBADP).	69
7.5.	Otrzymywanie kwasu N ² -tert-butoksykarbonylo-(S)-N ³ -[(2E)-3-(2-fenyl- 1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego]aminopropanowego.	71
7.6.	Otrzymywanie amidów BADP	72
7.7.	Otrzymywanie amidowych i N-metyloamidowych pochodnych kwasu glikolowego i mlekowego	75

7.8. Otrzymywanie amidowych i N-metyloamidowych pochodnych glicyny i L-alaniny.	76
7.9. Otrzymywanie ketoestrowych pochodnych kwasu N ³ -(4-metoksyfumaroil)-S-2,3-diaminopropanowego FMDP.....	78
7.10. Otrzymywanie ketoestrowych pochodnych BADP.	81
7.11. Otrzymywanie estrowych koniugatów z glikolamidami.	83
7.12. Otrzymywanie koniugatów FMDP z hydroksyamidami.	85
7.13. Otrzymywanie koniugatów FMDP z amidami aminokwasów.....	89
7.14. Wyznaczanie aktywności przeciwgrzybowej otrzymanych związków. ..	94
Podłoża stosowane w hodowli	94
7.15. Określanie szybkości transportu pochodnych FMDP i związków referencyjnych	95
7.16. Wyznaczanie inhibicji enzymu	96
8. Spis Tabel	97
9. Spis Rysunków	98
10. Spis dorobku naukowego	100
11. Literatura:	101

1. WSTĘP

Jednym z czynników postępującej rewolucji w dziedzinie medycyny było zastosowanie po raz pierwszy antybiotyków. Po odkryciu penicyliny przez Fleminga i kontynuacji badań przez Chaina Florey'a i Abrahama, nastąpiła złota era antybiotyków. Od tego momentu w różnych laboratoriach poszukiwano coraz to nowych substancji antybiotycznych, a ostatecznie podjęto próby otrzymania półsyntetycznych pochodnych antybiotyków o znacznie lepszych właściwościach.

Duża skuteczność, mnogość substancji oraz coraz łatwiejszy dostęp do antybiotyków doprowadził w konsekwencji do zbyt częstego ich stosowania. Ostatecznie nie tylko nie wyeliminowano zupełnie problemu związanego z mikroorganizmami chorobotwórczymi, ale pojawił się szereg zupełnie nowych zagrożeń. Zaobserwowano występowanie bakterii (m.in. szczep MRSA) opornych na stosowane dotychczas chemoterapeutyki.¹ W niektórych przypadkach zakażenie takim mikroorganizmem prowadziło do braku efektu terapeutycznego antybiotyku czy ostatecznie do śmierci pacjentów.

Innym negatywnym skutkiem stosowania antybiotykoterapii jest problem wyjąłowienia się naturalnej flory bakteryjnej człowieka. Brak symbiotycznych bakterii w organizmie człowieka tworzy wolną niszę środowiskową, która może zostać zaadaptowana przez patogeny grzybowe. Do rozwoju takiej sytuacji dodatkowo przyczynia się fakt znacznego postępu medycyny. Zwiększona liczba pacjentów z osłabionym układem odpornościowym prowadzi szczególnie do rosnącej fali zachorowalności na grzybice układowe.

Problem grzybic układowych jest istotny ze względu na fakt, że znalezienie skutecznego chemoterapeutyku przeciwgrzybowego jest bardzo skomplikowane. Trudności w opracowaniu nowych leków przeciwgrzybowych wynikają głównie z podobieństwa na poziomie komórkowym organizmów grzybów i ludzi. Rozwiązaniem tego problemu jest poszukiwanie nowych skutecznych substancji, spełniających wszystkie wymagania stawiane idealnym chemoterapeutykom przeciwdrobnoustrojowym.² Jedno z wymagań dotyczy substancji oddziałujących z wybranym celem molekularnym, obecnym tylko w komórkach zwalczanego mikroorganizmu.

W tę strategię wpisują się związki należące do grupy inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu, nad którymi prowadzone są już od wielu lat badania w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.

2. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AmB	amfoterycyna B
ATCC	amerykańska kolekcja kultur komórkowych, ang. American Type Culture
BADP	kw. (E)-N-(4-fenyl-4-okso-2-butenyl)-(S)-2,3-diaminopropanowy
Boc	grupa tert-butoksykarbonylowa
BocFMDP	kw. N ² -tert-butoksykarbonylo-N ³ -(4-metoksyfumaroylo)-L-2,3-diaminopropanowy
CH ₂ Cl ₂	chlorek metylenu
DBU	1,8-diazobicyklo[5.4.0]-undec-7-en
DCC	N,N'-dicykloheksylokarbodiimid
DMAP	N,N-dimetyloaminopirydyna
DMF	N,N-dimetyloformamid
DMSO	dimetylosulfotlenek
DON	6-diazo-5-okso-L-norleucyna
Et ₃ N	trietyloamina
	fazę ruchomą w chromatografii cienkowarstwowej
FMDP	kw. N ³ -(4-metoksyfumaroylo)-L-2,3-diaminopropanowy
Fru-6-P	D-fruktozo-6-fosforan
GAT	domena glutaminowa syntazy glukozamino-6-fosforanu
GlcN-6-P	glukozamino-6-fosforan
IC ₅₀	zahamowanie aktywności enzymu w 50% w stosunku do kontroli
MIC	minimalne stężenie hamujące wzrost, ang. minimal inhibitory concentration
MIC ₅₀	minimalne stężenie hamujące wzrost w 50% w stosunku do kontroli hodowli
NAG	N-acetyloglukozamina
Nva	norwalina
OD ₆₆₀	gęstość optyczna mierzona przy długości fali λ = 660 nm, ang. optical density
OPT	permeaza oligopeptydowa, ang. oligopeptide transport
PIDA	- dioctan jodobenzenu
Rf	stosunek długości drogi przebytej przez substancję do drogi przebytej przez t.t.
t.t.	temperatura topnienia
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografia cienkowarstwowa
TNBS	kw. 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy
YNB	pożywka minimalna, ang. Yeast Nitrogen Base

3. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

3.1. Infekcje grzybicze

Ocenia się, iż całkowita liczba gatunków grzybów na świecie przekracza 1500000.³ Jednak, tylko niewielka liczba, bo około 100 gatunków, jest przyczyną różnych chorób u człowieka. Infekcje wywołane przez patogeny grzybowe prowadzą do szerokiego zakresu chorób, w tym alergii, infekcji powierzchniowych i poważnych inwazyjnych grzybic.⁴

Każdy zdrowy człowiek może być narażony na grzybice powierzchniowe, do których zaliczyć można infekcje skóry, błon śluzowych i paznokci. Szacuje się, iż problem grzybicy powierzchniowej może dotyczyć nawet 25% społeczeństwa na świecie.⁵ Znacznie rzadziej u pacjentów obserwuje się występowanie grzybic systemowych, czyli ogólnoustrojowych zakażeń prowadzących do rozsianej po całym organizmie infekcji. Tego typu infekcje charakteryzuje nie tylko wysoka zachorowalność, ale również śmiertelność, która według niektórych badań dochodzi nawet do 50%.⁶ W ciągu ostatnich dwóch dekad częstotliwość inwazyjnych zakażeń grzybiczych (ang. IFI Invasive Fungal Infections) stale wzrasta⁷. IFI dotyczą poważnych infekcji narządów wewnętrznych, w szczególności organów takich jak płuca, wątroba, ale również stawy, czy zatoki. Tego rodzaju infekcje należą do przypadków szczególnych, wymagających wystąpienia warunków sprzyjających ich rozwojowi. Zakażenia grzybem patogennym w znacznej mierze zależą od statusu immunologicznego organizmu gospodarza. Osoby posiadające osłabiony układ odpornościowy są przeważnie bardziej narażone na zakażenie i rozwój poważnej infekcji grzybiczej.

Do grupy ryzyka należą pacjenci, którzy już w wyniku innych schorzeń posiadają osłabiony układ odpornościowy, a więc nosiciele wirusa HIV, chorzy na nowotwory, pacjenci po terapii immunosupresyjnej, ale także wcześniaki oraz pacjenci po długotrwałej antybiotykoterapii. Przypadki grzybic układowych to nie tylko infekcje *Cryptococcus* i *Aspergillus* wywołane przez chorobotwórcze mikroorganizmy pochodzące ze środowiska. Mogą to być również infekcje, których przyczyną jest nadmierny rozwój mikroorganizmów oportunistycznych. Statystyki wskazują, iż *Candida albicans*, gatunek grzyba zasiedlający fizjologiczną florę zdrowego człowieka u ponad połowy ludzkiej populacji, jest przyczyną także około 50–90% ludzkich kandydoz,⁸ przy czym 95% kandydoz

to infekcje spowodowane przez *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei*.⁹

Czynniki ryzyka najczęściej prowadzące do układowej kandydozy u dorosłych i dzieci przedstawione zostały w tabeli 1.

Czynniki ryzyka inwazyjnej kandydozy u dorosłych i dzieci:

- guzy układu krwionośnego i lite
- neutropenia
- niewydolność nerek
- ciężkie ostre zapalenie trzustki
- długi okres hospitalizacji w oddziale intensywnej terapii
- wysoki wynik APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation)
- hemodializa
- zastosowanie antybiotyków z szerokim spektrum
- obecność centralnych cewników żylnych
- wentylacja mechaniczna
- pełne żywienie pozajelitowego
- zastosowanie leków immunosupresyjnych
- kolonizacja grzybem z gatunku *Candida*
- zabiegi chirurgiczne
- zakażenie wirusem HIV

Tabela 1. Czynniki ryzyka inwazyjnej kandydozy¹⁰

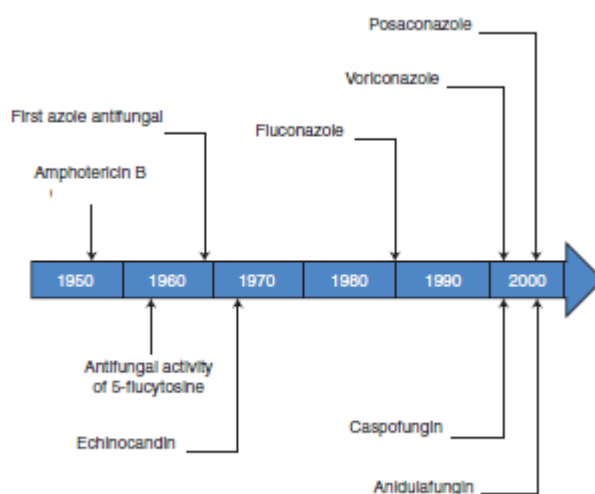
Narażenie na infekcję grzybem z rodzaju *Candida* i rozwinięcie się inwazyjnej kandydozy jest zależne nie tylko od czynników ryzyka znajdujących się po stronie gospodarza. Na zapoczątkowanie inwazyjnych grzybic systemowych wpływ ma także m.in. położenie geograficzne, dieta, warunki środowiskowe. Istotne znaczenie mają czynniki wirulencji charakteryzujące patogenny szczep. Szczególnie niebezpieczne mogą okazać się mikroorganizmy posiadające w swoim mechanizmie zjadliwości zdolność do tworzenia biofilmu, wykazujące polimorfizm czy zdolność do produkcji wyspecjalizowanych białek: adhezyn i inwazyjnych, umożliwiających łatwe wiązanie się i wnikanie do komórek gospodarza. Wiele szczepów z rodzaju *Candida* charakteryzują szerokie zdolności adaptacyjne, możliwość modyfikowania metabolizmu w zależności od dostępnego źródła pożywienia, łatwość reakcji na stres środowiskowy, czy produkcja białek szoku cieplnego.¹¹ Zatem identyfikacja szczepu i rozpoznanie jego zjadliwości informuje o potencjalnym zagrożeniu. Dodatkowo poznanie mechanizmów zjadliwości może dać nową szansę w terapii przeciwgrzybowej, ukierunkowanej na czynniki wirulencji.¹²

Zwiększona ilość przypadków infekcji *Candida* wśród osób podlegających intensywnej terapii, charakteryzuje się wyjątkowo wysokim ryzykiem zgonu, zwłaszcza gdy zakażenie

prowadzi do wstrząsu septycznego. Spóźniona terapia kandydemii może okazać się wyznacznikiem rezultatu leczenia i śmiertelności pacjentów¹³.

Problem grzybic układowych w mykologii klinicznej jest bardzo poważny i wymaga szczególnego zainteresowania. Szereg publikacji i danych statystycznych prezentuje liczebność opisanych przypadków grzybic systemowych. Istotę zagrożenia idealnie podsumowują dane zebrane w Stanach Zjednoczonych w latach 1979-2000, gdzie zarejestrowano wzrost o 207% ilości seps powodowanych przez mikroorganizmy grzybicze, co bezdyskusyjnie można określić najwyższym wzrostem u jakiegokolwiek opisanej grupy organizmów.¹⁴

Z biegiem czasu odkryty i przebadany został szereg leków przeciwgrzybowych, jednak jak wskazują dane, żaden z opracowanych dotychczas chemoterapeutyków nie sprawdza się wobec stawianych mu oczekiwań.¹⁵



Rysunek 1 Rys historyczny poszukiwania leków przeciwgrzybowych

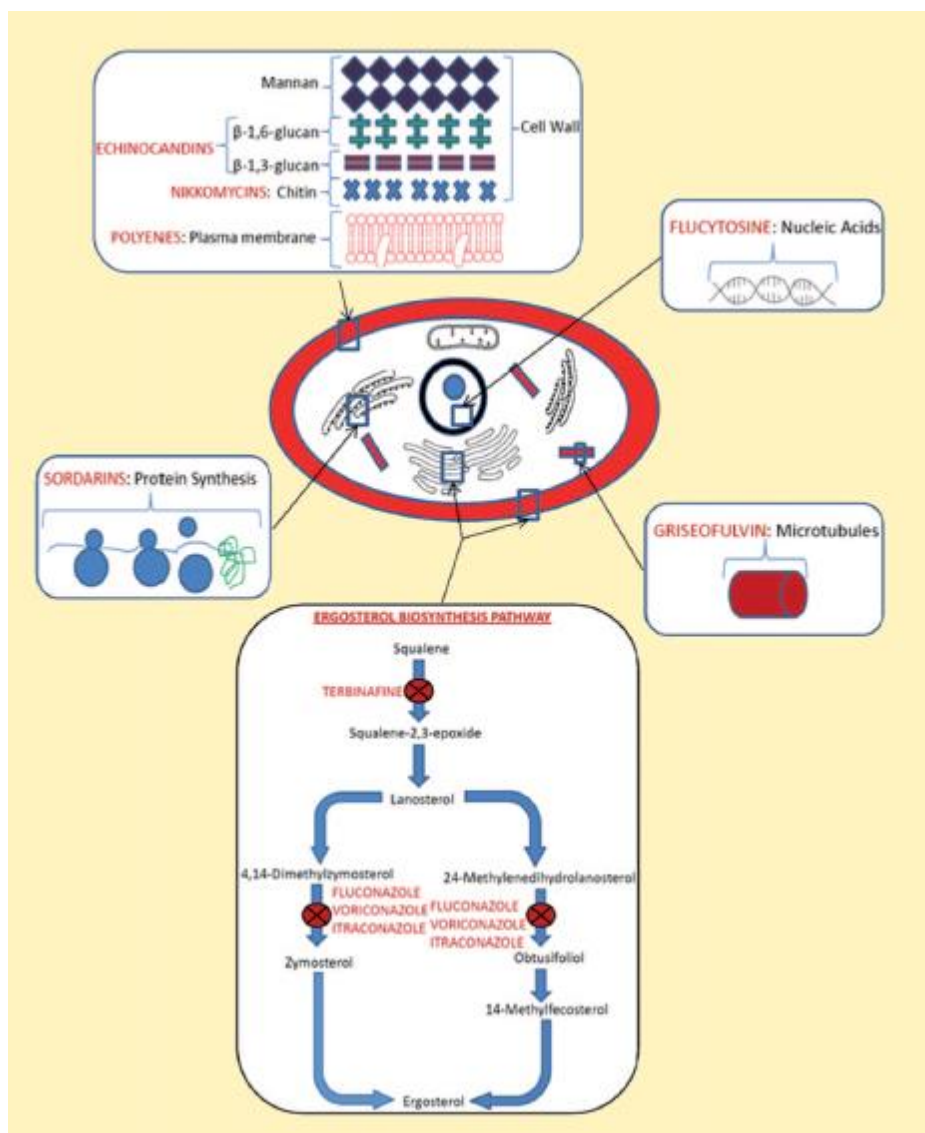
Wciąż prowadzone są badania mające na celu znalezienie nowych skutecznych substancji aktywnych, które sprawdziłyby się w chemoterapii przeciwdrobnoustrojowej.

3.2. Terapia grzybic układowych

3.3. Cele molekularne w terapii grzybic układowych

O ile w przypadkach zachorowania na grzybicę powierzchniową skuteczność terapii jest wysoka (możliwość korzystania z silnie toksycznych chemoterapeutyków ze względu na ich słabe wchłanianie do tkanek wewnętrznych i brak efektu toksycznego dla organizmu człowieka), tak w sytuacji infekcji systemowej skuteczność terapii przeciwgrzybowej jest znikoma. Przyczyna tego problemu jest widoczna już na poziomie molekularnym, ponieważ

między komórkami ludzkimi i grzybowymi istnieje wysoki stopień pokrewieństwa filogenetycznego (przynależność do eukariota). Oznacza to, że bardzo zbliżona budowa komórkowa staje się poważnym problemem w znalezieniu skutecznej substancji posiadającej wyłącznie efekt toksyczny dla komórek grzybów, a pozostającej bez efektu szkodliwego dla komórki gospodarza. Rozwiązania tego problemu poszukiwano właśnie w strukturach molekularnych komórek grzybów, w ich budowie oraz metabolizmie, ze względu na fakt, iż komórki ludzkie i grzybicze są podobne, ale nie identyczne. Zaproponowano kilka celów molekularnych dla terapii grzybic układowych.¹⁶ Zostały one zaprezentowane na schemacie:



Rysunek 2 Schemat głównych celów molekularnych w terapii przeciwgrzybowej.¹⁷

3.3.1. Inhibicja biosyntezy grzybowych steroli

Ergosterol jest jednym z kluczowych składników błony komórkowej grzybów, jest odpowiednikiem cholesterolu w komórkach zwierząt i pełni analogiczne funkcje.¹⁸ Do najważniejszych zadań ergosterolu w komórce należy regulacja płynności błony, jej asymetrii oraz integralności. Inhibitory biosyntezy ergosterolu oddziałują bezpośrednio na wybrane enzymy w szlaku, m.in. 14- α -demetylazę, której to zahamowanie powoduje zmniejszoną produkcję ergosterolu i prowadzi do towarzyszącego temu zjawisku wzrostu ilości 14-metylowanych steroli.¹⁹ Poza hamowaniem przekształcenia lanosterolu do ergosterolu, a w związku z tej grupy oddziałują także na przekształcenie skwalenu w komórkach, ostatecznie dając także efekt hamujący dla rozwoju komórki grzybowej.

Do głównych związków przeciwgrzybowych wpływających na syntezę ergosterolu należą azole, m.in. ketokonazol, itraconazol, flukonazol czy vorikonazol. Leki z tej grupy, częściowo już wycofane z użycia ze względu na występujące efekty uboczne i narastającą oporność, stosowane były jako pierwsze w terapii grzybic wewnętrznych. Obecnie stanowią główny element w profilaktyce grzybicy, ze względu na ich działanie grzybostatyczne.²⁰ Należący do nich flukonazol wykazuje najlepszą biodostępność, spowodowaną dobrą rozpuszczalnością związku w wodzie oraz niewielkim powinowactwem do białek osocza. Wśród nowych triazoli na uwagę zasługuje vorikonazol należący do drugiej generacji triazoli i stosowany jako lek pierwszego rzutu w inwazyjnych aspergilozach, choć również wykazujący jako skutki uboczne podrażnienie skóry, podniesienie poziomu transaminaz, encefalopatię czy halucynacje.²¹

Nowe triazole drugiej generacji to przede wszystkim leki stosowane prewencyjnie wobec inwazyjnej aspergilozy i kandydozy, np. postkonazol, ale także rawukonazol działający wobec szczepów opornych na flukonazol, szczególnie skuteczny u pacjentów zakażonych HIV.¹⁷

Konsekwencją tak szerokiego ich zastosowanie jest narastająca lekooporność, a także możliwość interakcji z dotychczas stosowanymi w terapii lekami (postaconazol oddziałuje na enzymy szlaku cytochromu P450, dlatego też stosowanie go z innymi lekami metabolizowanymi tym szlakiem może nie przynieść oczekiwanego skutku).

3.3.2. Inhibitory syntazy skwalenu- alliloaminy i morfoliny

Kolejną grupą związków o właściwościach przeciwgrzybowych są alliloaminy, które hamują produkcję ergosterolu poprzez inhibicję epoksydazy skwalenowej.²² Konsekwencją inaktywacji tego enzymu jest niedobór ergosterolu i akumulacja skwalenu wewnątrz komórki, co następnie prowadzi do przepuszczalności błony i śmierci komórki. W przypadku stosowania tych związków w terapii grzybic, także obserwowane były już przypadki oporności.

Głównym celem molekularnym, na który oddziałują związki tej grupy są enzymy szlaku biosyntezy lanosterolu: epoksydaza skwalenu i cyklaza skwalenu.²³ Zahamowanie aktywności enzymów powoduje zablokowanie przekształcenia skwalenu do lanosterolu, a w konsekwencji utrudnia przekształcenie lanosterolu w ergosterol. Do grupy tych związków zalicza się pochodne morfoliny, amorolinę i terbinafinę.

3.3.3. Związki wiążące się do ergosterolu - makrolidy polienowe

Makrolidy polienowe to związki, które należy zaliczyć do antybiotyków przeciwgrzybowych. Produkowane są przez mikroorganizmy produkcyjne, głównie promieniowce *Streptomyces*, jako substancje pozwalające na stworzenie konkurencji w środowisku wobec mikroorganizmów grzybowych. Częsteczki tych substancji tworzone są w szlakach biochemicznych, co pozwala na biosyntezę cyklicznej struktury zawierającej szereg wiązań podwójnych (sześciu wiązań w przypadku heptaenu-amfoterycyna B oraz czterech w tetraenie jakim jest nystatyna). Kształt tych związków oraz wysokie powinowactwo do steroli stanowi kluczowy element ich aktywności, gdyż wiążąc się z ergosterolem w błonie tworzą transbłonowe kanały prowadzące do wypływu składników komórki na zewnątrz i ostatecznie doprowadzając do lizy komórki.

Amfoterycyna B to jeden z głównych leków stosowanych w terapii grzybic układowych, wykazujący wysoką skuteczność, jednak posiadający wiele właściwości toksycznych, takich m.in. jak działanie nefrotoksyczne, neurotoksyczne. Najbardziej popularną formą podawania Amfoterycyny B jest połączenie z deoksyholanem sodu jako preparat Fungizon, ale stosowane są także modyfikacje chemiczne prowadzące do uzyskania półsyntetycznej formy leku. Największy efekt obniżonej toksyczności wykazują formy liposomalne amfoterycyny B.

Nystatyna została odkryta w 1950 roku i wciąż pozostaje w zastosowaniu, jako główny lek przeciwgrzybowy, ale jest również stosowana w szczególnych przypadkach grzybic. Charakteryzuje ją mniejsza toksyczność niż amfoterycyna B. Dodatkowo fakt, iż makrolidy nie ulegają wchłanianiu z układu pokarmowego, jest dobrym wskazaniem do stosowania tego leku w przypadkach grzybic jamy ustnej czy właśnie układu pokarmowego. Nowe organizmy modyfikowane genetycznie pozwalają na biosyntezę pochodnych nystatyny ze zmienionymi elementami strukturalnymi bądź odmiennymi składnikami kompleksu.

3.3.4. Inhibitory syntezy kwasów nukleinowych - antymetabolity

Antymetabolity to związki o właściwościach przeciwnowotworowych, co uzasadnia ich zdolność do inhibicji syntezy kwasów nukleinowych: DNA i RNA. Nieobecność w komórkach ssaczych enzymu deaminazy cytozynowej uniemożliwia przekształcenie 5-fluorocytozyny do 5-fluorouracylu. Jest to podstawą selektywnej toksyczności tego związku wobec organizmów przeciwgrzybowych. Niestety spektrum działania tych związków nie jest zbyt szerokie, a stosowanie prowadzi do spontanicznej lekooporności.

3.3.5. Inhibitory syntazy β -(1,3)-glukanu.

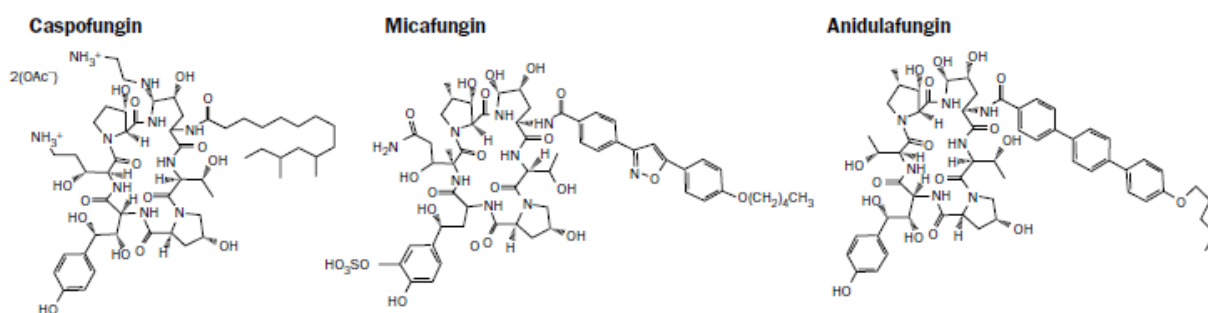
Ściana komórkowa w zależności od gatunków grzybów wykazuje odmienny skład. W większości przypadków głównym składnikiem, bo w ilości około 30-60%, pozostaje β -(1,3)-glukan. β -glukan należy do grupy polisacharydów naturalnie występujących w ścianie komórkowej wielu organizmów, m.in. zbóż, bakterii, drożdży i innych grzybów, przy czym u tych ostatnich jego obecność ma szczególne znaczenie dla zapewnienia wytrzymałości i strukturalnej integralności ściany oraz stabilności osmotycznej. Związek ten zbudowany jest z połączonych w różny sposób (np. β -(1,3)- i β -(1,6)-glukan) monomerów D-glukozy i wykazuje odmienne właściwości fizykochemiczne w zależności od struktury. W komórce zmniejszona zawartość tego składnika może doprowadzić do osłabienia ściany komórkowej, prowadząc ostatecznie do osmotycznej lizy komórki.

Za produkcję β -(1,3)-glukanu na drodze biosyntezy odpowiada jeden z enzymów określony jako syntaza glukanu. Jego inhibicja skutkuje ograniczeniem ilości tego polisacharydu w komórce, co zostało zaproponowane jako kolejny cel molekularny w terapii przeciwgrzybowej. Wśród chemoterapeutyków oddziałujących z tym enzymem można wyróżnić echinokandyny, enfumafungin oraz papulakandyny.

Echinokandyny

Echinokandyny to duże (masa ok. 1200 Da), lipopetydowe cząsteczki. W zastosowaniu klinicznym czy jeszcze na etapie projektowania wszystkie z tych związków charakteryzują się obecnością cyklicznego amfifilowego pierścienia heksapeptydowego, z N-acylowanym lipidowym łańcuchem bocznym różnej długości. Główne z nich to:

- anidulafungin z alkoksyfenylowym (terfenyl) podstawnikiem, który jako LY303366 został zidentyfikowany w 1974 roku;
- w 1989 opisano caspofungin (MK991) związek zawierający łańcuch kwasu tłuszczowego- obecnie na rynku pod nazwą Cancidal,
- micafungin (FK463), którego prekursor został wyodrębniony w 1990, w skład którego wchodzi aromatyczny łańcuch boczny (3,5-difenyl-podstawiony izoksazol)



Rysunek 3 Struktury związków należących do grupy echinokandyn

Do analogicznej grupy otrzymanych związków, należą substancje uzyskane na drodze fermentacji, ale także ich modyfikowane chemicznie pochodne. Dla wszystkich związków z tej grupy skład pierścienia polipeptydowego jest specyficzny, ponieważ zawiera dihydroksyornitynę, 4-hydroksyprolinę, dihydroksyhomotyrozynę i 3-hydroksy-4-metyloprolinę, uzupełnione w peptydowym rdzeniu o cząsteczki treoniny. Znajdujący się w ich cząsteczkach łańcuch boczny odpowiada za interkalację do fosfolipidów występujących w błonie komórkowej.²⁴ Pomimo, iż mechanizmy działania tych związków są podobne, to spektrum działania okazuje się być odmienne. Przykładem może być anidulafungin, wykazujący aktywność wobec opornych na azole czy polieny szczepów *Candida* i *Aspergillus*, stąd też związek ten można nazwać mianem ratującego życie.²⁵ Obserwuje się jednak przypadki zmniejszonej wrażliwości na echinokandyny u *Candida* ze względu na mutacje w genach w regionach FKS. Obecność tych mutacji prowadzi do zmian aminokwasowych w dominującej podjednostce białka docelowego - syntazy

glukanu.²⁶ Mutacje zmniejszają wrażliwość syntazy β -glukanu na lek, co wymusza zwiększenie dawki nawet 100-krotnie, jednak kliniczne przypadki takiej oporności zdarzają się dość rzadko.²⁷

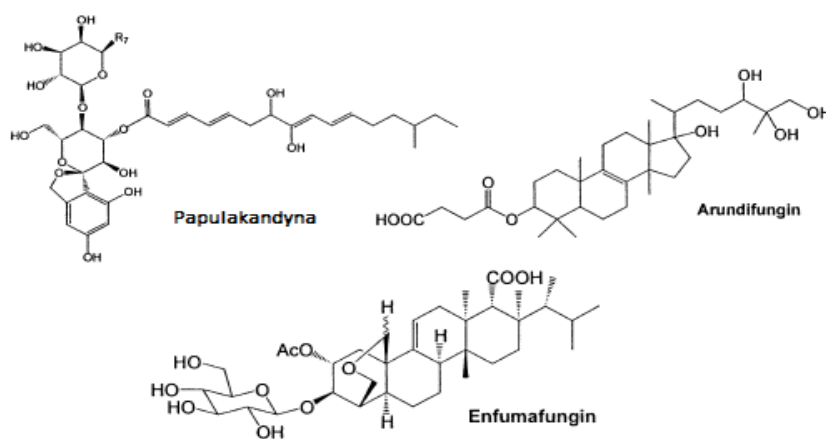
Jak widać, inhibitory syntazy β -(1,3)-D-glukanu są istotną alternatywą dla leków przeciwgrzybiczych wiążących się do ergosterolu. Niemniej jednak ich słaba biodostępność na drodze doustnej jest ich głównym ograniczeniem, przez co związki te podawane są tylko w postaci preparatów dożylnych.

3.3.6. Inne inhibitory syntazy β -glukanu

Dotychczas oprócz cyklicznych lipopeptydów znane są tylko dwa inne rodzaje inhibitorów syntezy glukanu, papulakandyny oraz triterpeny.²⁸

Papulakandyny są glikolipidami odkrytymi w latach 1970. W ostatnim czasie został zaproponowany szereg analogicznych związków, skądinąd wszystkie z nich są pochodzenia naturalnego i produkowane są przez grzyby. Pomimo wysiłków chemii medycznej, ani papulakandyny, ani żadne z ich pochodnych nie zostały zastosowane jako leki. Przede wszystkim ze względu na ich wąskie spektrum działania oraz niższą skuteczność w badaniach *in vivo*, w stosunku do wyników *in vitro*.²⁹

Do stosunkowo niedawno odkrytych związków należących do klasy inhibitorów syntezy glukanu należą triterpeny. Do tej grupy można zaliczyć polarny glikozyd (enfumafungin), bursztynian (w arundifungin) lub siarczanową pochodną aminokwasu (ergokonin A) (rysunek 4).

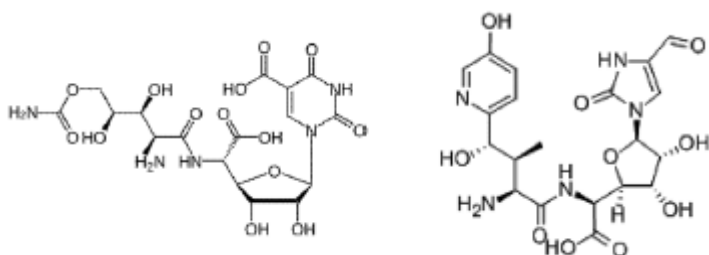


Rysunek 4 Struktury chemiczne innych inhibitorów syntazy glukanu

3.3.7. Inhibitory biosyntezy chityny

Chityna to jeden z elementów budulcowych ściany komórkowej, przy czym procentowo wchodzi w jej skład w niewielkiej ilości, bo około 1%. Pomimo niskiej zawartości, ten liniowy polisacharyd ma jednak istotne znaczenie dla kształtu komórki oraz cytokinezy. Ten nierozpuszczalny homopolimer jest zbudowany z cząsteczek N-acetyloglukozaminy połączonych ze sobą wiązaniem β -(1,4)-glikozydowym, pomimo iż w ścianie komórkowej tworzy odrębną warstwę, związany jest z glukanem poprzez wiązanie kowalencyjne.³⁰

Do najlepiej poznanych, głównych inhibitorów syntazy chitynowej należą nikomycyna i polioksyna. Oba te związki posiadają podobne elementy strukturalne, do których należy nukleozydowy szkielet i jedna bądź dwie reszty peptydylowe oraz mechanizm inhibicji (działają jak kompetytywne analogi UDP-N-acetyloglukozaminy - substratu w reakcji biosyntezy chityny).^{31,32}



Rysunek 5 Struktury inhibitorów syntazy chityny

Zastosowanie kliniczne inhibitorów syntazy chityny jest obecnie mało prawdopodobne z powodu wykazywania słabej aktywności *in vivo*, ze względu na ich niestabilność hydrolityczną i nieefektywną przepuszczalność ściany komórkowej grzybów. Klinicznie użyteczne aspekty wykorzystania nikomycyny mogą pochodzić z jej dodatkowej lub synergistycznej interakcji z innymi lekami przeciwgrzybiczymi.³³ Ponieważ nie są to związki toksyczne dla komórek ssaków, dlatego także stanowią one potencjalne modele do opracowania skutecznych leków w leczeniu zakażeń grzybiczych.

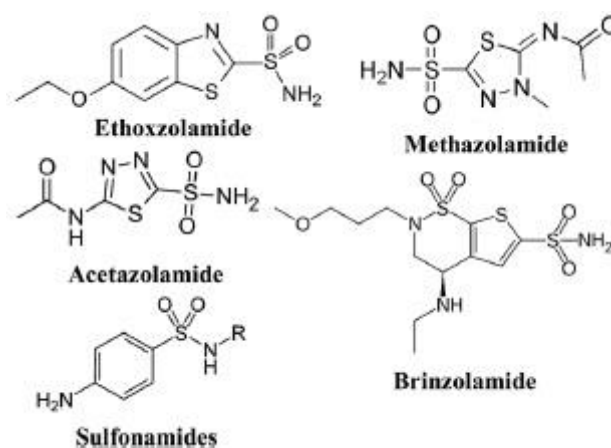
3.3.8. Inhibitory anhidrazy węglanowej

Anhidrazy węglanowe to metaloenzymy odpowiadające za przemianę CO_2 do wodorowęglanu, który jest następnie wykorzystywany w metabolizmie komórkowym. Wśród enzymów wyodrębniony został podział na α , β , γ , δ i ζ , a także η . CO_2 , wodorowęglan i proton są podstawowymi cząsteczkami / jonami w wielu procesach fizjologicznych, obecnych we wszystkich królestwach życia (*bakterie, archea i eukariotów*).

Z tego też powodu poznano wiele rodzajów tych enzymów, a ich obecność zaobserwowano w wielu miejscach komórek czy tkanek większości poznanych organizmów.³⁴

Hamowanie aktywności anhidrazy węglanowej ma farmakologiczne zastosowanie w wielu dziedzinach, takich jak leki przeciwnowotworowe, przeciwdrgawkowe, leczenie otyłości i środki przeciwnowotworowe czy narzędzia diagnostyczne. Jednakże inhibitory anhidrazy węglanowej mają zastosowanie również przy projektowaniu środków przeciwnowotworowych, to znaczy substancji przeciwrzybiczej i przeciwbakteryjnej o nowym mechanizmie działania.³⁵

Dotychczas poznano dwie główne klasy inhibitorów: metalo-kompleksujące aniony, a także niepodstawione sulfonamidy i ich bioizostery, na przykład związki z grupy sulfaminianów i sulfamidów.³⁶



Rysunek 6 Inhibitory anhidrazy węglanowej

Sulfonamidy to najbardziej klasyczne i najszerzej badane substancje z tych dwóch grup związków. Obecność grupy RSO_2NH_2 w strukturze inhibitorów czyni je bardzo aktywnymi wobec anhidrazy węglanowej, stąd też rośnie potencjał pochodnych z tej grupy związków, na znalezienie nowego leku przeciwdrobnoustrojowego. Wiele z tych związków, w tym metazolamid, etoksyzolamid, brynzolamid, benzolamid wykazują aktywność hamującą wobec Can2 - jednej z form anhidrazy węglanowej zaangażowanej między innymi w przeżywalność i proliferację w środowisku,³⁷ np. u *C. neoformans*³⁸ czy aktywację cyklazy adenylowej. Natomiast dla jednego z najstarszych leków, jakim jest metazolamid, stwierdzono istotne działania niepożądane, takie jak zaburzenia równowagi elektrolitowej i rozwój kwasicy. Acetazolamid wydaje się być najlepszym inhibitorem enzymu,³⁹ jednakże podobnie jak dichlorofenamid oraz benzolamid, wykazują niską siłę działania i słabą

selektywność wobec grzybów. W związku z tym poszukiwanie nowych klas inhibitorów β -CA (nie obecnych u ssaków) o wysokiej specyficzności jest obecnie przedmiotem badań wielu grup badawczych. Ditiokarbaminiany zaproponowano niedawno, jako nowej klasy inhibitorów o podobnym mechanizmie działania, jak w przypadku sulfonamidów, przez wiązanie się z jonem metalu w centrum aktywnym enzymu.⁴⁰

3.3.9. Inhibitory szlaków biosyntezy aminokwasów

Spośród 20 aminokwasów białkowych, dziewięć jest uważane za szczególnie istotne dla ludzi, należą do nich: fenyloalanina, walina, treonina, tryptofan, metionina, izoleucyna, leucyna, lizyna i histydyna. Źródłem tych aminokwasów, niezbędnych do optymalnego rozwoju i wzrostu, może być tylko dieta, jednakże bakterie, rośliny i grzyby rozwinęły własne sposoby biosyntezy tych aminokwasów. Kilka etapów z tych szlaków katalizowanych jest poprzez enzymy, które nie są obecne w komórkach ssaków.

Te unikalne dla komórek drobnoustrojów elementy metabolizmu są potencjalnymi celami w projektowaniu nowych selektywnych chemioterapeutyków. Związki te przyjmują postać antymetabolitów strukturalnie podobnych związków pośrednich lub produktów końcowych pierwotnych szlaków metabolicznych. Dodatkowo są one słabymi substratami dla białek błonowych uczestniczących w transporcie ksenobiotyków, którego obecność odpowiada za występowanie grzybowej oporności wielolekowej.⁴¹ Dodatkowo, jak w przypadku *A. fumigatus*, wiadomym jest, że niektóre szlaki biosyntezy aminokwasów, wpływają na jego zjadliwość, określając patogenność szczepu. Hamowanie aktywności enzymów odpowiadających za mechanizm zjadliwości może znaleźć kolejne zastosowanie w chemoterapii. Biosyntezę lizyny, aromatycznych aminokwasów czy tych zawierającą siarkę, takich jak metionina i cysteina, przebadano pod kątem ich roli w patogenezie *A. fumigatus*.⁴²

Dzięki wykonaniu szeregu badań przesiewowych, została zaproponowana pewna liczba inhibitorów należących do grupy związków odpowiedzialnych za inaktywację wielu ze szlaków biosyntezy aminokwasów. Obejmuje ona związki oddziałujące na dehydrogenazę homoseryny, kinazę homoseryny czy też transacetylazę homoseryny. Wśród nich zaproponowana została cząsteczka kwasu (S)-2-Amino-4-okso-5-hydrokspentanowego, definiowana także jako RI-331 - antybiotyk produkowany przez *Streptomyces*. Związek ten jest aktywny wobec poważnych z punktu widzenia medycznego

drożdży i niektórych pleśni, ale nie ma efektu przeciw *Aspergillus* spp.⁴³ Co więcej, RI-331 okazał się skuteczny w leczeniu mysiej układowej kandydozy, a dodatkowo jest dobrze tolerowany przez myszy.⁴⁴

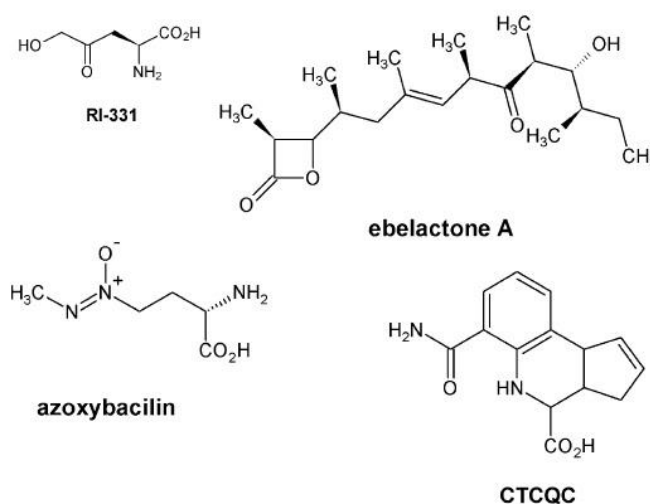
Przykładem inhibitorów wskazujących na obiecujące właściwości przeciwgrzybowe jest substancja naturalna, ebelakton A i jego syntetyczne pochodne, które są także inhibitorami bakteryjnej transacetylazy homoseryny.⁴⁵ Azoksybacillin, inny produkt naturalny z *B. cereus*, wykazuje działanie antagonistyczne w stosunku do *Aspergillus* spp., jednakże zaobserwowano dla niego słabą biodostępność na modelach zwierzęcych.⁴⁶

Podobnie, w biosyntezie metioniny jako inhibitor zaproponowano związek 6-karbamoilo-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyklopenta[c]chinolino-4-karboksylowy (CTCQC), dla którego jako cel molekularny zasugerowano również enzym transacetylazę homoseryny. Związek ten wykazywał jednak słabą przeciwgrzybiczą aktywność.⁴⁷ Podobnie wśród enzymów w tym szlaku zaproponowano jako cel molekularny syntazę metioniny, dla której wykazane zostało, że jej inhibitorami jest popularny w terapii grzybowej flukonazol, jak i związek FK506, który wykazywał niezbyt zadowalające wartości MIC w badaniach *in vitro*.

Dla szeregu patogennych szczepów z gatunku *Aspergillus* oraz *Candida* zaobserwowano szlak kwasu α -adypinowego - element szlaku biosyntezy lizyny, jako potencjalne miejsce poszukiwania nowych inhibitorów, dla których można znaleźć zastosowanie także w rolnictwie.

Poszukiwania związków przeciwgrzybiczych w obrębie inhibitorów biosyntezy leucyny i waliny zostały skoncentrowane, na związkach, które wykazywały wcześniej aktywność jako inhibitory wzrostu grzybów chorobotwórczych u roślin lub herbicydy.

Syntaza aceto hydroksy kwasu (Ilv2p) katalizuje pierwszy etap biosyntezy waliny i leucyny, zatem inhibitory tego enzymu mogą być skutecznymi środkami przeciwgrzybicznymi. Jako inhibitory tego enzymu zaproponowano związki sulfonilomocznikowe.⁴⁸ Ze względu na niską cytotoksyczność oraz wysokie powinowactwo do syntazy aceto hydroksy kwasów, związki należące do pochodnych sulfonilomocznika wydają się być idealnym punktem wyjścia dla rozwoju nowych leków przeciwgrzybiczych.



Wiele związków tego typu było badanych pod kątem ich zdolności do hamowania wzrostu *C. albicans* w pożywkach do hodowli komórkowej i w metodzie dyfuzyjnej. Najsilniejszymi inhibitorami są pochodne sulfonilomocznika, jednakże inne inhibitory: etoksylsulfuron oraz chlorimuron etylowy prezentują jednak odmienne wartości aktywności.⁴⁹

Odnotowano również enzym: NAD(P)-zależną dehydrogenazę glutaminianu, jako jeden z punktów kontroli metabolizmu grzybów odnoszących się do transformacji morfologicznych. Stwierdzono, iż silnymi inhibitorami tego enzymu mogą być związki otrzymane w formie koniugatów 1,2,3-triazol- β -laktamu i kwasów żółciowych B18 i B20.

W przypadku innych aminokwasów istnieje małe prawdopodobieństwo wykorzystania w chemioterapii przeciwgrzybiczej szlaków biosyntezy cysteiny, ze względu na występowanie dwóch alternatywnych szlaków.

Podsumowując, wiele ze związków o obiecującej aktywności hamowania enzymu w szlaku biosyntezy aminokwasów są skuteczne *in vitro*, ale nie zawsze okazują się

silniejsze w warunkach *in vivo*. Chociaż działanie przeciwgrzybicze *in vitro* jest bardzo efektywne, w warunkach *in vivo* komórki grzybowe wykorzystują obecność wymaganych aminokwasów w krwi gospodarzy, co uczyni te inhibitory nieskutecznymi.

Jednakże dostępność metioniny i tryptofanu jest znacznie niższa w surowicy ssaków i nie jest wystarczająca dla grzybów, dla ich prawidłowego wzrostu i rozwoju. W związku z tym, inhibitory enzymów biosyntezy metioniny i tryptofanu wydają się być najbardziej obiecującymi kandydatami do wykorzystania w terapii.

3.3.10. Inhibitory syntazy glukoazmino-6-fosforanu

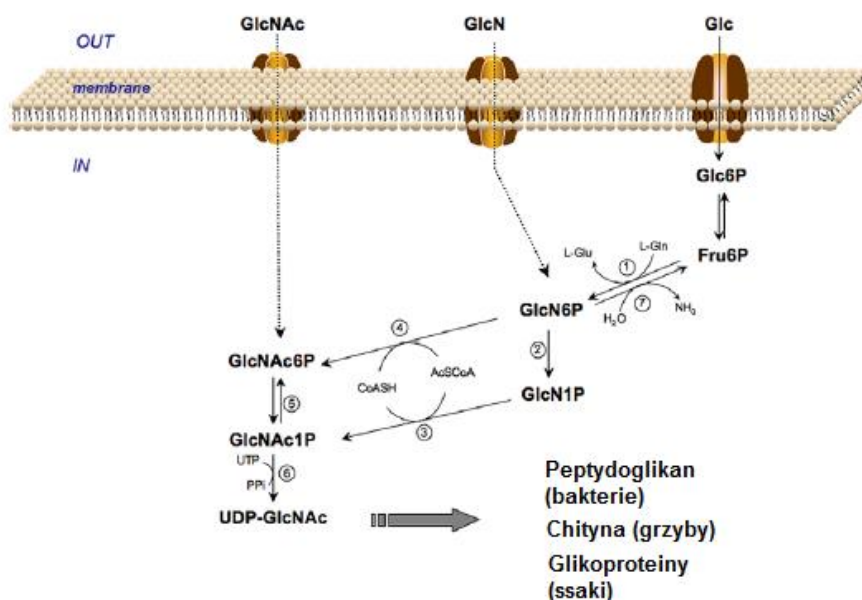
Syntaza glukoazmino-6-fosforanu

Enzym syntaza glukoazmino-6-fosforanu (w skrócie GlcN-6-P) należy do rodziny amidotransferaz, a w systematyce jest określona nazwą L-glukoamina : D-fruktoza-9-fosforan amidotransferaza EC 2.6.1.16.. Enzym ten odgrywa kluczową rolę w regulacji metabolicznej biosyntezy makrocząsteczek zawierających cukier aminowy.

Szlak biosyntezy heksozamin rozpoczyna się początkowo z cząsteczki D- fruktozo- 6-fosforanu (Fru6P), wytworzonego z glukozy na drodze glikolizy. Następnie Fru-6-P przekształca się w D-glukoazmino-6-fosforan (GlcN6P) przez aktywność enzymu - syntazy glukoazmino-6-fosforanu (GlcN6P syntazy). Syntazę GlcN6P w zależności od jej pochodzenia prokariota czy niższego lub wyższego eukariotycznego określa się różnymi terminami m.in. : GImS, Gfa lub Gfat.

Jak dotąd ten proces to jedyna znana droga biosyntezy D-glukoazmino-6-fosforanu. GlcN6P może ulegać ponownemu deaminowaniu do Fru6P i amoniaku przez deaminazę GlcN6P. Enzym ten, pomimo, iż wykonuje reakcję odwrotną do GImS, stanowi element kataboliczny w szlaku wykorzystywania cukrów aminowych, jako źródła węgla. Te dwie konkurencyjne aktywności muszą być jednak w komórce prowadzone w odmiennych miejscach, ze względu na sprzeczną aktywność.

Następnie w szlaku biosyntezy GlcN6P poddaje się izomeryzacji do D-glukozamino-1-fosforanu (GlcN1P) poprzez mutazę fosfoglukozaminy, a dalej przy udziale urydyny poprzez enzym acetylotransferazę przekształcony zostaje do urydyno-difosfo-N-acetylo-D-glukozaminy (UDP-GlcNAc). Te elementy szlaku dokładnie prezentuje rysunek 7:



Rysunek 7 Szlak biosyntezy heksozoamin

UDP-GlcNAc jest aktywną formą N-acetyloglukozaminy, która stanowi ważny element peptydoglikanu bakteryjnego czy lipopolisacharydów u gram-ujemnych bakterii, chityny i mannoprotein w ścianie komórkowej grzybów, a także glikoprotein i mukopolisacharydów u organizmów wyższych. Dodatkowo mannozamina i galaktozaminowe pochodne konieczne w syntezie polimerów takich, jak chondroityny i siarczan keratanu, powstają przez epimeryzację C-2 i C-4 UDP-GlcNAc. Cukier ten, zawierając w strukturze nukleotydowy fragment, jest substratem dla praktycznie wszystkich ścieżek glikozylacji potencjalnie zaangażowanych w regulację glukozy.

Zaburzenie aktywności syntazy glukozamino-6-fosforanu ma szczególnie niekorzystny wpływ na biosyntezę ściany komórkowej u drobnoustrojów. Brak produktów reakcji katalizowanej przez enzym uniemożliwia prawidłowe tworzenie ściany, w jej strukturze powstają luki, a w konsekwencji poważne defekty w budowie prowadzą do lizy komórki. W komórkach ssaczych enzym również pełni funkcje w syntezie glikolipidów i glikoprotein, jednak zahamowanie aktywności enzymu nie przynosi poważnych skutków dla komórki, nie obserwuje się efektu letalnego. Najświeższe badania sygnalizują także

zastosowanie syntazy Glc-6-P jako potencjalnego celu molekularnego do walki z problemem cukrzycy. Enzym jako intermediat w syntezie aminocukrów wpływa na poziom glukozy w komórkach. Badania pokazują, że u osób chorych na cukrzycę typu II obserwuje się nadmierną aktywność enzymu syntazy Glc-6-P, co w konsekwencji prowadzi do insulinooporności. Można przewidywać, że inhibicja enzymu może mieć pozytywny wpływ na regulację zaburzonych procesów w komórkach eukariotycznych. W tym kontekście jest niezwykle ważne, aby poznać strukturę oraz aktywność enzymu, w szczególności mechanizm katalizy tego .

Syntaza GlcN-6-P należy do klasy enzymów GATT amidotransferaz glutaminozależnych, które katalizują przeniesienie amidowego atomu azotu L-glutaminy do różnych akceptorów. Do tej rodziny zalicza się blisko 20 enzymów, przy czym niektóre (np. zaangażowane w biosyntezę histydyny lub tryptofanu) są ograniczone występowaniem wyłącznie u mikroorganizmów. Porównanie mechanizmu generowania amoniaku w obrębie tej rodziny enzymów doprowadziło do zidentyfikowania dwóch głównych podklas. Enzymy należące do klasy I wykorzystują w mechanizmie działania aminokwas triady katalitycznej, natomiast enzymy klasy II, do których należy m.in. syntaza GlcN6P, swoją aktywność wykazują poprzez działanie N-końcowej cysteiny, prowadzące do zerwania wiązania amidowego L-glutaminy i przeniesienia grupy aminowej.

Dotychczas glutamino-zależnych amidotransferaz zostało opisanych kilkanaście i do tej rodziny należą enzymy odpowiadające za biosyntezę puryn i pirymidyn, niektórych aminokwasów, koenzymów, antybiotyków i w szczególności glukozamino-6-fosforanu. Enzymy z tej grupy charakteryzuje wiele specjalnych właściwości, jak np. brak wymogu kofaktorów czy też zdolność do wiązania egzogenego amoniaku, jako alternatywnego źródła azotu w stosunku do L-glutaminy.

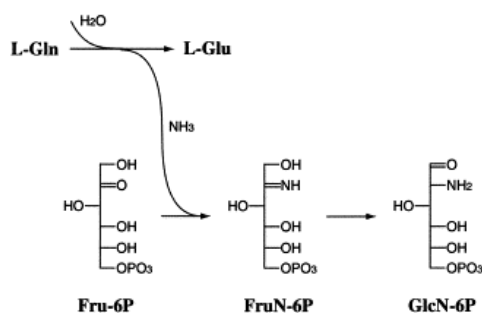
Mechanizm katalizowanej reakcji.

Wśród wszystkich dotychczas poznanych syntaz GlcN6P, szczegółowo zbadano kinetyczny mechanizm działania białka pochodzącego z *E. coli*.⁵⁰ Reakcja katalityczna składa się z następujących etapów: hydrolizy glutaminy, transferu amoniaku oraz izomeryzacji utworzonego intermediatu iminowego: FruN-6-P do GlcN-6-P. W pierwszej kolejności następuje utworzenie wiązania Fru-6-P, a następnie z glutaminą.⁵¹ Formacja GlcN-6-P jest głównym mechanizmem działania GlcN-6-P syntazy. Jednakże, w przypadku braku Fru-6-P,

enzym katalizuje tylko hydrolizę glutaminy do kwasu glutaminowego. Natomiast w przypadku braku glutaminy enzym dalej wykazuje aktywność, przy czym zachowuje się, jak izomeraza fosfoglukozowa. Zatem brak glutaminy w środowisku reakcji nie powoduje zahamowania aktywności domeny izomerażowej. W tych warunkach enzym katalizuje odwracalną izomeryzację Fru-6-P do Glc-6-P.⁵²

Mechanizm aktywności enzymu wskazuje na fakt prowadzenia reakcji dwójakiego typu, katalitycznej i hydrolitycznej, co ma swoje odzwierciedlenie w strukturze enzymu. Wszystkie z enzymów należących do glutamino-zależnych amidotransferaz, a zatem również syntaza GlcN-6-P, charakteryzują się posiadaniem dwóch centrów aktywnych, zlokalizowanych w dwóch domenach:

- domena transferu amidu glutaminy (ang. glutamine amide transfer domain (GAH)) odpowiadająca z hydrolizę glutaminy
- domena syntazowa (ISOM), odpowiedzialna za tworzenie i izomeryzowanie Fru-6-P.⁵³



Rysunek 8 Reakcja katalizowana przez GlmS.

Aby możliwe było zajście zaprezentowanej na rysunku 5 reakcji, konieczny jest transfer grupy aminowej pomiędzy dwiema domenami w strukturze enzymu. Co ciekawe, są już dostępne struktury krystalograficzne wskazujące iż dwa miejsca wiążące wewnątrz enzymu, dedykowane Fru-6-P i L-Glu są od siebie oddalone o 20 Å, co silnie sugeruje istnienie w budowie syntazy GlcN-6-P kanału dla cząsteczki amoniaku.⁵⁴

Inhibitory syntazy GlcN-6-P.

Syntaza glukozamino-6-fosforanu została obecnie dość dobrze zbadana, co pozwoliło na znalezienie szeregu związków mających zdolność do hamowania jej aktywności. Ważnym elementem znacznie ułatwiającym poszukiwanie nowych związków było zbadanie centrum aktywnego, zanalizowanie jego budowy i składu aminokwasów go

tworzących, a także mechanizmu wiązania substratów czy inhibitorów. Do znanych specyficznych inhibitorów syntazy GlcN-6-P należą związki klasyfikowane do dwóch różnych grup strukturalnych: analogi L-glutaminy i analogi stanu przejściowego w reakcji cukru w C-końcowej domenie izomerazowej.

Okazuje się, że zasadniczą rolę w oddziaływaniach inhibitora z centrum aktywnym pełni grupa tiolowa Cys1.⁵⁵ Aminokwas ten jest odpowiedzialny za wiązanie L-glutaminy, a w przypadku oddziaływań z inhibitorem zachodzi nieodwracalne alkilowanie Cys1.

Zdolności inhibicyjne w stosunku do syntazy glukozamino-6-fosforanu wykazuje szereg niewielkich związków o zdolnościach oddziaływania z centrum aktywnym. Związki te niestety charakteryzują się brakiem selektywności ze względu na możliwość wiązania się do innych enzymów. Są to np.: N-etyloimid kwasu maleinowego, jodoacetamid, dietylopirowęglan czy fosforan pirydoksalu.⁵⁶

Do grupy inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu należą także związki o charakterze elektrofilowym w postaci diazoketonu - DON (6-diazo-5-okso-L-norleucyna), diazoestru (azaseryna) i 2,3-epoksyketonu (antakapsyna) czy chloroketonu-CONV (kwas L-2-amino-4-okso-5-chloropentanowy). W przypadku syntazy glukozamino-6-fosforanu, DON trwale wiąże się z enzymem, powodując jego trwałą inaktywację.⁵⁷ Antykapsyna to wyizolowany naturalnie niebiałkowy aminokwas, który wchodzi w skład antybiotyku tetajny.⁵⁸ Antykapsyna wykazuje znacznie większe powinowactwo do miejsca wiązania glutaminy w niszy enzymatycznej niż sama glutamina - naturalny substrat syntazy GlcN-6-P.⁵⁹ Niestety ten skuteczny inhibitor nie znalazł zastosowania w terapii, gdyż wykazywał działanie cytotoksyczne.^{60, 61}

Analogi D-fruktozo-6-fosforanu

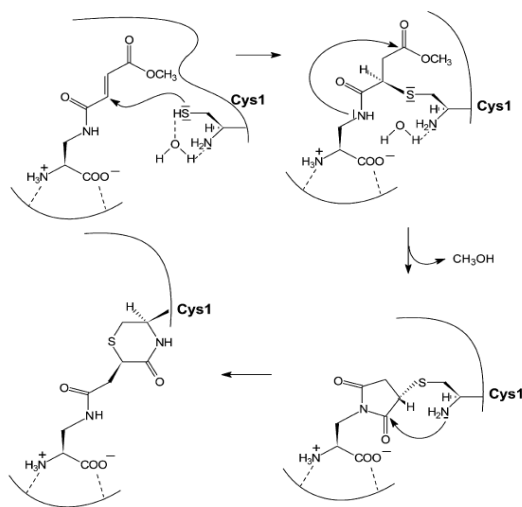
Inhibicyjne działanie tej grupy analogów polega na blokowaniu domeny izomerazowej syntazy GlcN-6-P, zatem domeny wiążącej substrat D-fruktozo-6-fosforan. Związki w tej grupie należą do analogów stanu przejściowego pracującego enzymu - cis-enoloaminy.^{62, 63} Są to APO (oksym arabinozo-5-fosforan), AMPO (6-fosforan-2-amino-2-deoksy-D-glucitol), MPAH (5-metylenofosfono-D-arabinozohydroksymolakton).

Niestety wykorzystanie tych związków w terapii przeciwgrzybowej jest trudne, ze względu na ich właściwości, gdyż cząsteczki te wykazują słaby charakter lipofilowy. Zaproponowano odpowiednie modyfikacje tych związków w celu poprawy biodostępności:

między innymi grupę aminową acetylowano, a grupę fosforanową estryfikowano. Zbadano, iż modyfikacje zwiększyły lipofilowość AGDP, ale niestety zmniejszyła się zdolność inhibicji enzymu. Natomiast estryfikacja 6-fosforan-2-amino-2-deoksy-D-glucitolu znacznie poprawiła aktywność tego analogu, co dało sygnał do kierunku modyfikacji kolejnych związków, w kierunku poprawy ich działania przeciwgrzybowego.⁶⁴

Analogi L-glutaminny

Cennym antybiotykiem o właściwościach inhibitora syntazy GlcN-6-P okazał się dipeptyd A 19009, występujący naturalnie, wyizolowany ze *Streptomyces collinus*. W skład cząsteczki wchodzi L-alanina i kwas N³-fumaramoilo-(S)-2,3-diaminopropanowy (FCDP).⁶⁵



Rysunek 9 Mechanizm inhibicji enzymu syntazy GlcN-6-P przez cząsteczkę FMDP

Skuteczność tej grupy związków jest oparta na ugrupowaniu, które będzie zdolne do reakcji z grupą tiolową Cys1 w centrum aktywnym enzymu (mechanizm inhibicji prezentuje rysunek 9⁶⁶).

Jednocześnie tego typu element elektrofilowy nie powinien być podatny na działanie innych centrów nukleofilowych występujących w komórce. Mogą to być związki zawierające grupę oksiranową, epoksyketonu, diazoestru, diazoketonu czy wiązanie podwójne. Związkami należącymi do grupy najskuteczniejszych inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu są FMDP, EADP, BSDP.

4. CEL I ZAKRES BADAŃ

Celem pracy było otrzymanie na drodze syntezy chemicznej inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu zawierających w swych strukturach pochodne amidowe i estrowe (z funkcją amidową oraz karbonylową). Zaproponowane do otrzymania związki, należące do grupy zmodyfikowanych inhibitorów FMDP i BADP, miały spełniać warunek zwiększonej lipofilowości oraz lepszej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, przy czym zachować wciąż cechy inhibitora enzymu syntazy glukozamino-6-fosforanu.

Zakres badań prowadzonych w ramach realizacji przedstawionego celu obejmował:

- syntezy inhibitorów FMDP i BADP podlegających modyfikacjom
- projektowanie drogi syntezy zaplanowanych pochodnych i ich otrzymanie
- potwierdzenie struktur otrzymanych związków na podstawie wyników badań spektroskopowych

-badania aktywności związków *in vitro* wobec różnych szczepów mikroorganizmów oraz interpretację wyników inhibicji enzymu poprzez otrzymane pochodne

- sprawdzenie sposobu transportu związków do wnętrza komórek mikroorganizmów dla najbardziej aktywnych pochodnych

5. WYNIKI I ICH DYSKUSJA.

5.1. Projektowanie nowych inhibitorów

Badania aktywności inhibitorów syntazy glukoamino-6-fosforanu wykazały, że FMDP, jak i BADP charakteryzowały się dobrym powinowactwem do enzymu (dla FMDP wynoszącym IC_{50} 4 μ M, a dla BADP ok. 200 μ M).^{67,68} FMDP opisano dotychczas jako jeden z najbardziej specyficznych i najsilniejszych inhibitorów enzymu, natomiast BADP jako jeden z najbardziej lipofilowych inhibitorów. Związki te wykazują słabą aktywność biologiczną w testach *in vitro* co, mimo ich silnych właściwości inhibicyjnych, raczej wyklucza możliwości zastosowania tych substancji jako potencjalne leki przeciwdrobnoustrojowe.

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii przez wiele lat prowadzone były badania polegające na modyfikacjach opracowanych dotychczas inhibitorów. Ich zmiany strukturalne miały na celu poprawę biodostępności poprzez łatwiejszy transport do wnętrza komórki oraz zwiększenie zdolności inhibitora do wiązania się z centrum aktywnym enzymu. Najbardziej szczegółowo zaprojektowane i przebadane zostały pochodne FMDP. Ta niewielkich rozmiarów molekula inhibitora charakteryzuje się małą liczbą grup funkcyjnych, przez co sposoby modyfikacji tego związku są ograniczone.

Projektowane i otrzymane wcześniej pochodne zawierały zamiast elementu kwasu fumarowego, czyli układu α,β -nienasyconego (α -enonu), inne ugrupowania zdolne do reakcji z grupą tiolową, obecną w centrum aktywnym enzymu. Do grupy tych związków należą pochodne zawierające w cząsteczce układ oksiranowy⁶⁹ czy kwas α -halogenoctowy⁷⁰. Mimo że związki te posiadały niezbędny elektrofilowy fragment podatny na atak grupy tiolowej, to wskazywały mniejszą aktywność niż wiodąca cząsteczka FMDP.

Dlatego w projektowaniu nowych inhibitorów syntazy glukoamino-6-fosforanu unika się zmian w miejscu wiązania podwójnego, pozostawiając w cząsteczce ugrupowanie elektrofilowe. Jest ono silnie podatne na interakcję z Cys 1, istotną z punktu widzenia mechanizmu inaktywacji enzymu syntazy glukoamino-6-fosforanu.

Niestety zarówno FMDP, jak i BADP są zbyt polarne, aby mogły być transportowane do wnętrza komórki na drodze prostej dyfuzji. Jednym ze sposobów transportu związków przez błonę cytoplazmatyczną jest wykorzystanie systemu transportu aminokwasów

i peptydów. Wśród otrzymanych do tej pory koniugatów FMDP, najbardziej aktywnymi związkami okazały się pochodne dipeptydowe, gdzie najaktywniejszym z nich okazał się dipeptyd L-norwalilo-FMDP.^{71, 72} Wprawdzie aktywność przeciwdrobnoustrojowa tego związku była dość wysoka przy niskich stężeniach, to dalsze badania wykazały pojawienie się oporności u mikroorganizmów. Badania transportu dipeptydu dowiodły, że związek ten jest transportowany do komórek drobnoustrojów przez permeazy peptydowe. Krótkotrwałe wyłączenie tego systemu transportu u drobnoustrojów skutkuje pojawieniem się spontanicznej oporności na peptydy zawierające inhibitor syntazy GlcN-6-P.⁷³ Dlatego poszukiwano innych lipofilowych pochodnych, których transport mógłby przebiegać na zasadzie dyfuzji prostej lub z wykorzystaniem innych nośników.

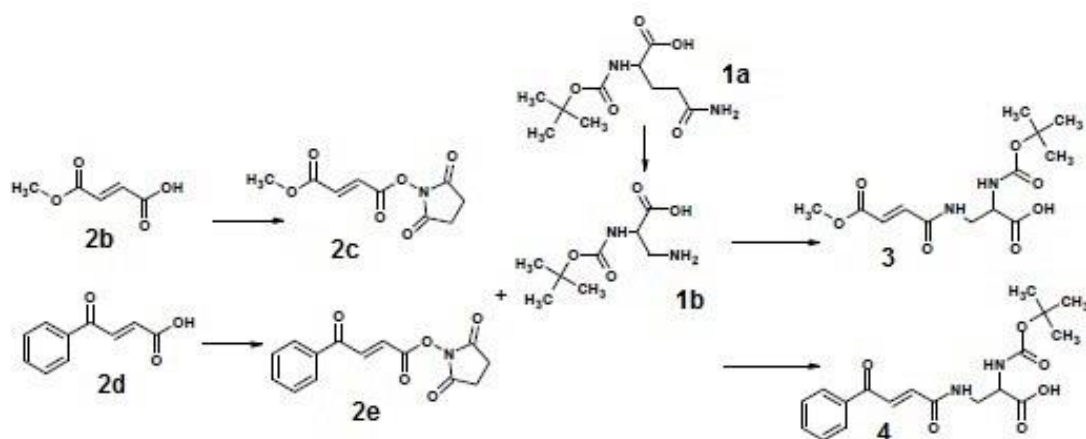
Badania prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii wskazują, iż proste modyfikacje grup funkcyjnych cząsteczki FMDP prowadzą do obniżenia lub zaniku właściwości inhibicyjnych związku. Dla przykładu, acylowanie grupy aminowej skutkuje zanikiem zdolności inhibicyjnych, natomiast estryfikacja wolnej grupy karboksylowej również nieznacznie obniża właściwości inhibicyjne (dla pochodnej AcFDMP uzyskano wartość $IC_{50} > 150 \mu M$, a dla pochodnej FMDPOMe $IC_{50} = 44 \mu M$).^{74 75} Stąd można wnioskować, że modyfikacje grupy karboksylowej FMDP mogą prowadzić do otrzymania nowych pochodnych, wykazujących wciąż aktywność inhibicyjną.

W badaniach nad inhibitorami syntazy glukozamino-6-fosforanu przedstawiono szereg analogów FMDP, będących estrami i amidami.⁷⁶ Dodatkowo, zakres pochodnych został poszerzony także o lipofilowe estry zaprojektowane w formie koniugatów bicyny, co miało stanowić nowy sposób transportu inhibitora do komórek.⁷⁷ Pochodne te miały spełniać funkcje latentnych połączeń, jednocześnie wpływając na znaczną poprawę lipofilowości związku. Modyfikacje te oparte były na przykładzie korzystnych zmian strukturalnych w związkach biologicznie czynnych, m.in. penicyliny.⁷⁸ Ta droga projektowania nowych chemoterapeutyków opierała się na konstrukcji proleków, czyli tworzeniu labilnych połączeń związku aktywnego z substancją o charakterze obojętnym pod względem aktywności, ale korzystnym z punktu widzenia transportu do wnętrza komórki. Otrzymana w ten sposób pochodna leku po wniknięciu do komórki ulega przekształceniom przez wewnątrzkomórkowe enzymy (acylazy, hydrolazy, esterazy), aż do uwolnienia substancji aktywnej, spełniającej założone funkcje.

5.2. Syntezy inhibitorów FMDP i BADP

Modyfikacje chemiczne inhibitorów syntazy glukoazmino-6-fosforanu poprzedzone zostały syntezą wymienionych inhibitorów FMDP i BADP zgodnie z opracowanymi dotychczas metodami.⁷⁹

Procedura otrzymywania każdego z tych związków składała się z dwóch etapów, zaprezentowanych na schemacie:



Rysunek 10 Schemat syntezy Boc-FMDP i Boc-BADP

Synteza kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroylo)- S -2,3-diaminopropanowego (Boc-FMDP) opierała się na stworzeniu wiązania amidowego między cząsteczką kwasu L-2,3-diaminopropanowego (otrzymanego poprzez przegrupowanie Hofmanna Boc-L-asparaginy) a monoestrem metylowym kwasu fumarowego. Jako metodę syntezy wiązania amidowego wykorzystano metodę estrów aktywnych.⁸⁰

Otrzymywanie kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo- (S) - N^3 -[(E)-4-fenyl-4-okso-2-butenoylo]-2,3-diaminopropanowego (Boc-BADP) przebiegało według analogicznej procedury z wykorzystaniem estru N -hydroksysukcynimidowego kwasu 4-okso-4-fenyl-2-obutenowego.

5.3. Synteza amidów FMDP i BADP oraz określenie ich aktywności biologicznej.

5.3.1. Synteza amidów FMDP i BADP

W dotychczas prowadzonych badaniach amidy FMDP otrzymano na drodze reakcji inhibitora z aminami, zawierającymi podstawniki alkilowe różnej wielkości: od grupy

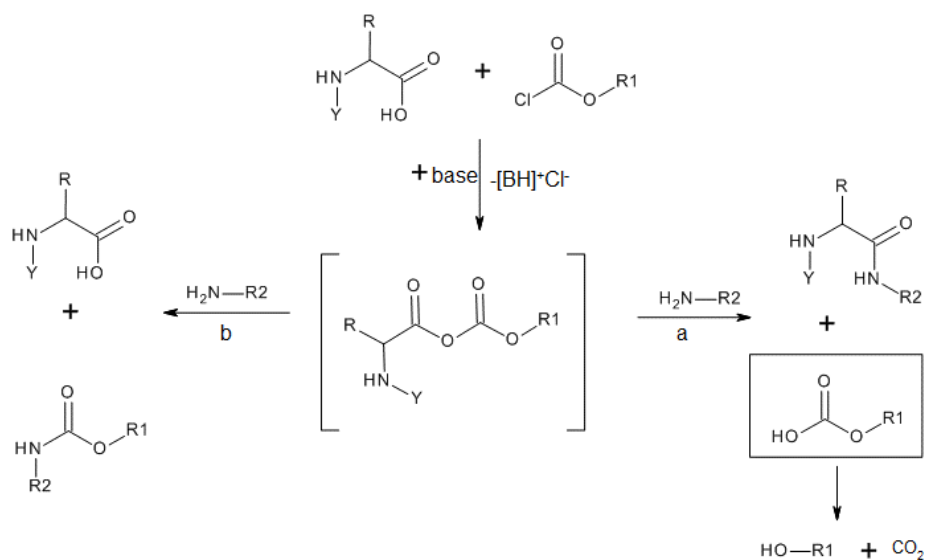
metylowej, po propylową, izopropylową, sec-butyłową czy heksylową. Pomimo tych modyfikacji, wskazujących na znaczną poprawę lipofilowości tych związków, inhibicja enzymu utrzymywała się na poziomie od 500 po 2910 μM .⁸¹ Modyfikacje grupy karboksylowej, przez wprowadzenie podstawnika znacznej objętości, mogły wpłynąć na utrudnienie oddziaływania związku z centrum aktywnym enzymu, co zaobserwowano przez zwiększoną wartość IC_{50} .

W toku badań amidowych analogów FMDP zaobserwowano, iż zastosowanie niewielkich podstawników amidowych nie wpływa istotnie na zmianę kształtu cząsteczki inhibitora. Wprowadzenie nieznacznych modyfikacji na grupie karboksylowej inhibitora pozwala na zachowanie oddziaływań enzym - inhibitor.

W niniejszej pracy zaprojektowano syntezę szeregu pochodnych inhibitorów FMDP i BADP. W tym celu zaplanowano syntezą kilku amidów FMDP i BADP. Otrzymano je w wyniku reakcji inhibitorów z amoniakiem, *N*-metyloaminą i *N,N*-dimetyloaminą, po uprzedniej aktywacji grupy karboksylowej. W tym celu funkcje karboksylową przeprowadza się w bardziej podatny na reakcję aminolizy chlorek kwasowy, ester czy bezwodnik.

Aminokwasowy charakter inhibitorów wymaga zastosowanie łagodnych warunków syntezy, uwzględniających stabilność otrzymanych związków. Zatem, do syntezy amidów FMDP i BADP zaplanowano strategię mieszanych bezwodników.⁸² Metoda ta wykazuje skuteczność w tworzeniu wiązania peptydowego, jak również jest wykorzystywana do modyfikacji aminokwasów. W tej reakcji najczęściej stosowane są estry alkilowe kwasu chloromrówkowego (estry alkilowe kwasu chlorowęglowego), w szczególności chloromrówczan etylu czy chloromrówczan izobutyli. Użycie w syntezie chloromrówczanu izobutyli, jak i zastosowanie *N*-metylomorfoliny jako zasady, chroni związki przed racemizacją, co w przypadku syntezy z udziałem aminokwasów jest dość istotne. Utworzony z substratu karboksylowego i chloromrówczanu alkilu mieszany bezwodnik ulega aminolitycznemu rozszczepieniu przy atomie węgla aminokwasu, skutkując powstaniem aminokwasu podstawionego grupą aminową i uwolnieniem kwasu

pomocniczego, który natychmiast rozpada się do CO₂ i odpowiedniego alkoholu (droga „a” na schemacie).



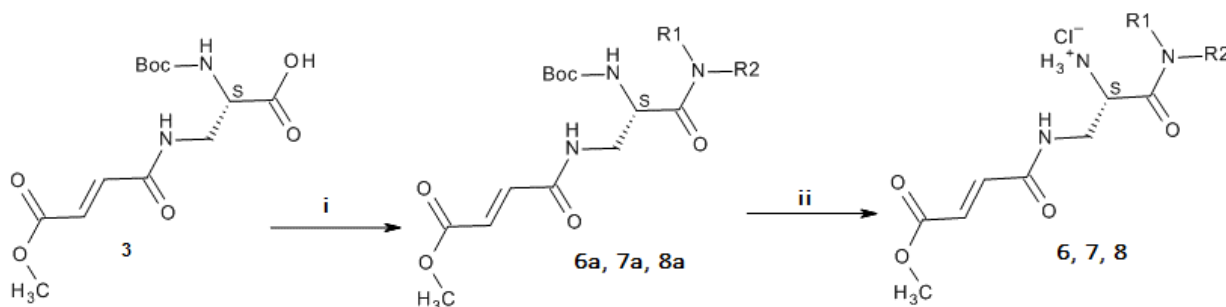
Rysunek 11 Schemat reakcji w metodzie mieszanych bezwodników. a-aminoliza aktywowanego aminokwasu; b-reakcja dysproporcjonowania

W tej metodzie można zaobserwować konkurencyjną do reakcji aminolizy aminokwasu reakcję dysproporcjonowania. W reakcji tej dochodzi do ataku nukleofilowego aminy na odmienną grupę karbonylową niż grupa karbonylowa aminokwasu. Podstawienie na elektrofilowym atomie węgla kwasu tworzącego mieszany bezwodnik, prowadzi do eliminacji acyloaminokwasu, a produktami ubocznymi reakcji są uretany (droga „b”). Tej teoretycznej reakcji można uniknąć poprzez zastosowanie w trakcie syntezy obniżonej temperatury (poniżej 0°C).

Postępując zgodnie z opisaną metodą, reakcję Boc-FMDP z dodatkiem *N*-metylomorfoliny prowadzono w obniżonej temperaturze i traktowano stechiometryczną ilością chloromrówczanu izobutyli. Po kilku minutach do mieszaniny reakcyjnej wkroplono porcję 23,9% roztworu amoniaku w metanolu. Reakcję kontynuowano przez 48h, a po tym czasie przeprowadzono oczyszczanie produktu przez ekstrakcję.

Uzyskanie wysokich wydajności tej reakcji jest trudne ze względu na fakt stosowania roztworu amoniaku, co skutkuje problemem z doбором dokładnej

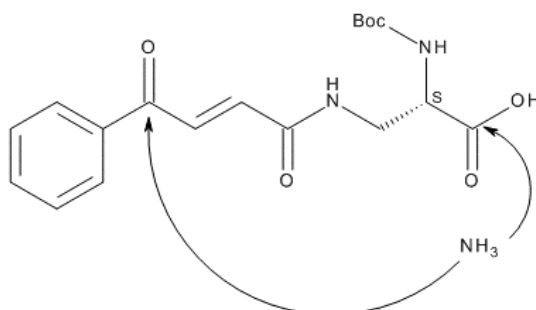
stechiometrii reakcji. Dodatkowo w cząsteczce substratu obecne są inne grupy funkcyjne (ester metylowy, wiązanie podwójne), które mogą także reagować z amoniakiem.



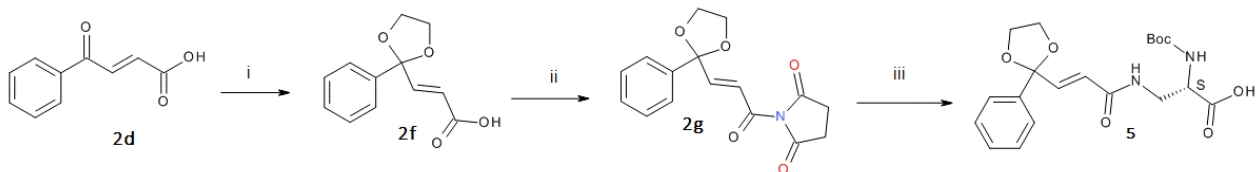
Rysunek 12 Schemat syntezy amidów FMDP. i-1-N-metylomorfolina, chloromrówczan sec-butylu, THF, -10°C , 10min; 2. NH_3/MeOH (6a); $\text{CH}_3\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}$ (7a); $\text{NH}(\text{CH}_3)_2/\text{H}_2\text{O}$ (8a); 24h; ii-HCl/Dioksan, 4 godz.

Metoda mieszanych bezwodników zastosowana została także w syntezie metyloamidów FMDP zaprezentowanych na schemacie. W trakcie syntezy pochodnej N,N- dimetyloamidowej zaobserwowano powstające zanieczyszczenia, które wymagały usunięcia metodą chromatografii kolumnowej.

Synteza amidu Boc-BADP początkowo prowadzona była według procedury opisanej dla amidów FMDP. Jednakże analiza chromatograficzna po krótkim czasie syntezy wskazywała obecność zanieczyszczeń. Pojawienie się zanieczyszczeń może być związane z obecnością bardzo podatnej na atak nukleofilowy grupy karbonylowej kwasu 4-fenyl-4-oksobutenowego.



Rysunek 13 Schemat ataku cząsteczki amoniaku na Boc BADP



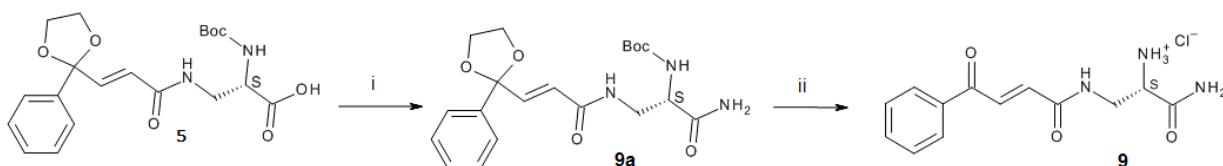
Rysunek 14 Schemat syntezy ketalu Boc-BADP (i-1.glikol etylenowy, ortomórczan trietylu, kwas p-TsOH/benzen, 2. KOH/MeOH, 3. H⁺; ii- N, hydroksysukcynoimid, DCC/THF; iii- kwas S-2,3-diaminopropanowy, NaHCO₃, H₂O/THF, 24 h

Wystąpienie kilku produktów reakcji sugerowało konieczność zabezpieczenia grupy funkcyjnej karbonylowej, mogącej reagować z grupą aminową. Zabezpieczenie funkcji karbonylowej BADP przebiegało według reakcji przedstawionych na schemacie.⁸³

Do zabezpieczenia grupy karbonylowej kwasu 4-fenyl-4-okso-2-butenowego zastosowano glikol etylenowy, benzen jako rozpuszczalnik oraz dodatek ortomórczanu trietylu i katalitycznej ilości kwasu p-TsOH.⁸⁴ Produktem tej reakcji była mieszanina kwasu (E)-3-(2'-alkilo-1',3'-dioksolan-2'-ylo)-2-propenowego i jego estru. Następnie wykonano hydrolizę zasadową produktu reakcji otrzymując sól, której zakwaszenie przekształciło związek w wolny kwas. Związek ten w dalszym etapie oczyszczony przez krystalizację, aż do otrzymania białych kryształów kwasu (E)-3-(2'-alkilo-1',3'-dioksolan-2'-ylo)-2-propenowego.

Kolejny etap syntezy przebiegał zgodnie z reakcją zaprezentowaną na schemacie..... Związek 2f przeprowadzono w reakcji z N-hydroksysukcynimidem i DCC w odpowiedni ester aktywny, który następnie przeprowadzono w kwas N²-tert-butoksykarbonylo-(S)-N³-[(2E)-3-(2-fenyl-1,3-dioksolan-2-ylo)-2-propenowo]aminopropanowy w reakcji sprzęgania z chronionym kwasem S-2,3-diaminopropanowym.

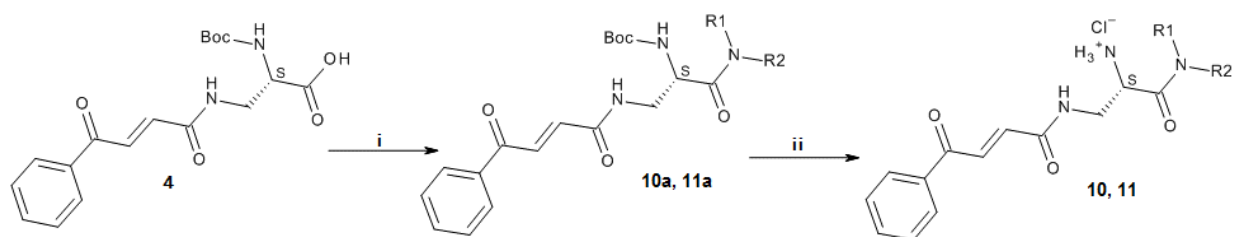
Produkt syntezy przeprowadzono w mieszanym bezwodniku i potraktowano amoniakiem w metanolu, a reakcję prowadzono, aż do zaobserwowania odpowiedniej ilości produktu za pomocą analizy chromatograficznej. Produkt reakcji oczyszczono przez wytrącenie przy użyciu z eteru dietylowego.



Rysunek 15 Schemat syntezy amidu BADP (i-1.N-metylmorfolina, chloromórczan sec-butylo, THF, -10°C, 10min; 2. NH₃/MeOH; ii-HCl/dioksan

Uzyskany związek 9a wciąż zawierał grupę zabezpieczającą funkcję karbonylową. Usunięcie ketalu z grupy karbonylowej było konieczne w celu przywrócenie właściwości inhibitora i zostało wykonane jednocześnie w trakcie reakcji usuwania grupy zabezpieczającej *tert*-butoksykarbonylowej gazowym chlorowodorem w dioksanie.

Otrzymywanie N-metylo i N,N-dimetyloamidu kwasu N^2 -(S)- N^3 -[(E)-4-fenyl-4-oksobutenoi]daminopropanowego przeprowadzono zgodnie z opisaną wcześniej procedurą dla związków 7, 8 izolując oczekiwane produkty. Reakcje prowadzono według procedury zaprezentowanej na rysunku 16.



Rysunek 16 Schemat syntezy N-metylo (10) i N,N-dimetyloamidu BADP (11) [1.N-metylomorfolina, chloromrówczan *sec*-butylu, THF, -10°C, 10min; 2. CH₃NH₂/H₂O (10a) lub NH(CH₃)₂/H₂O(11a); ii-HCl/dioksan

5.3.2. Omówienie wyników aktywności biologicznej amidów FMDP i BADP

Przeprowadzono badanie wpływu podstawników amidowych na grupie karboksylowej inhibitorów na aktywność przeciwdrobnoustrojową związków i inhibicyjną enzymu syntazy glukozy-6-fosforanu.

Dla otrzymanych związków wyniki aktywności biologicznej przedstawiono w tabeli:

Związek	MIC ₈₀ [µg/ml]							
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
6	4	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>.1024
7	32	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
8	512	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
9	>1024	>1024	>1024	nb	nb	nb	nb	nb
10	>1024	>1024	>1024	nb	nb	nb	nb	nb
11	>1024	>1024	>1024	nb	nb	nb	nb	nb
FMDP	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
BADP	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

Tabela 2 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa amidów FMDP i BADP.

Testy hamowania wzrostu drobnoustrojów dla związków 6-11 wykonano wobec różnych szczepów grzybów z rodzaju *Candida* oraz wobec bakterii gram dodatnich i gram ujemnych. Wyniki wskazały jedynie na aktywność przeciwdrobnoustrojową związków będących amidami FMDP. Nie zaobserwowano w zakresach badanych stężeń zdolności do hamowania wzrostu mikroorganizmów w przypadku pochodnych BADP. Wśród badanych związków najbardziej aktywny okazał się amid pierwszorzędowy FMDP. Aktywność pochodnych spadała wraz ze wzrostem ilości grup metylowych na amidowym atomie azotu oraz wskazywała na specyficzną zdolność tych związków do hamowania wzrostu jedynie dla szczepu *Candida albicans*. Spadek właściwości przeciwdrobnoustrojowych następował wraz ze wzrostem lipofilowości związków. Wynik ten wskazał, iż zdolność do hamowania wzrostu drobnoustrojów nie jest zależna od lipofilowości amidów FMDP. Dodatkowo, dla tych związków wykonano oznaczenie parametru IC_{50} .

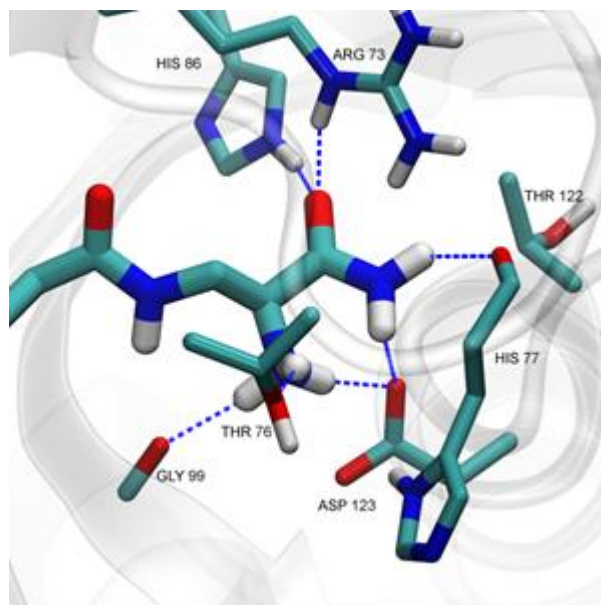
Związek	IC_{50} [mM]
6	0,08 ±0,0059
7	0,127±0,0126
8	2,894±0,331
9	1,216±0,085
10	0,489±0,037
11	0,370±0,010
FMDP	0,004±0,00026
BADP	0,256±0,0027

Tabela 3 Wyniki inhibicji syntazy glukozamino-6-fosforanu przez amidy FMDP i BADP.

Analiza wyników IC_{50} potwierdziła fakt, iż związki z tej grupy wykazują słabsze właściwości inhibicyjne syntazy glukozamino-6-fosforanu niż niezmienione FMDP i BADP. Dodatkowo w przypadku amidów FMDP zaobserwowana została korelacja pomiędzy zdolnością tych pochodnych do hamowania wzrostu *C. albicans* a wartością parametru IC_{50} . Najbardziej aktywny z pochodnych amid pierwszorzędowy, również jest jednym z najsilniejszych inhibitorów enzymu, przy czym wzrost ilości podstawników metylowych w przypadku amidów FMDP wskazywał na spadek inhibicji enzymu. Natomiast w przypadku

amidowych pochodnych BADP zaobserwowana została sytuacja odwrotna. Większa ilość podstawników na amidowym atomie azotu poprawiała zdolność pochodnej do inhibicji enzymu.

Właściwości inhibicyjne amidów FMDP wskazują na fakt odpowiedniego dopasowania tych związków do centrum aktywnego enzymu. Wyniki modelowania molekularnego wykazały najbardziej prawdopodobny sposób wiązania się pochodnych 6, 7, 8 z centrum aktywnym enzymu syntazy glukoamino-6-fosforanu.

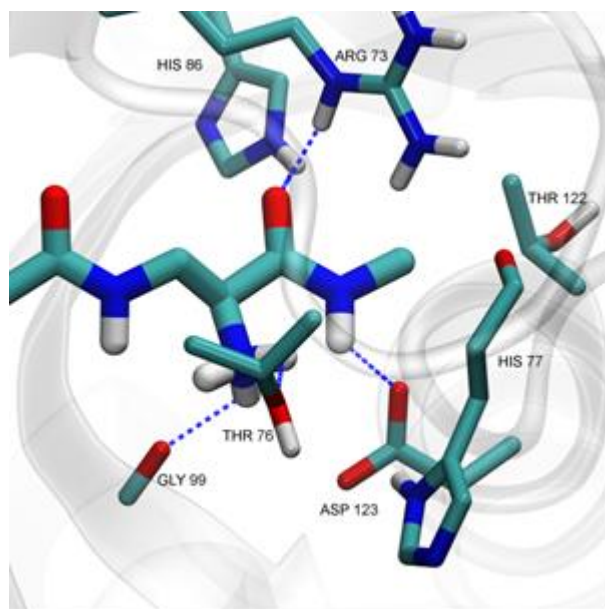


Rysunek 17 Oddziaływania pierwszorzędowego amidu FMDP z enzymem syntazą GlcN-6-P

Wyniki okazały się bardzo obiecujące dla pierwszorzędowego amidu FMDP, gdyż wskazały na najniższą energię i układ najbardziej przypominający oddziaływania z ligandem (HGA - hydroksyglutaminą) (rys. 17)⁸⁵. Niemodyfikowana grupa amidowa FMDP odtwarza interakcję odpowiedniej grupy amidowej i natywnej glutaminy z resztami aminokwasów Gly99, Thr76 i Asp123. Pomimo faktu, że najkorzystniejsze oddziaływania z enzymem obserwujemy w ujemnie naładowanej grupie karboksylowej obecnej w FMDP, to w zaprojektowanych inhibitorach ugrupowanie amidowe jest w stanie częściowo odtworzyć korzystne oddziaływania z enzymem, jak również tworzą się nowe oddziaływania. Mianowicie ugrupowanie karbonylowe, obecne w amidzie, naśladuje oddziaływania grupy karboksylowej FMDP z łańcuchami bocznymi aminokwasów Arg73 i His86 z udziałem wiązań wodorowych (O----HN odległości 1,87 i 1,88). Z drugiej strony okazuje się, że grupa NH₂ amidu, tworzy słabe wiązania wodorowe z grupą karboksylową łańcucha bocznego Asp123 i grupą karbonylową His77 (odległości NH----O 2,18 i 2,13).

Wszystkie te interakcje z udziałem reszt aminokwasowych są niezbędne do stworzenia możliwości oddziaływania syntazy GlcN-6-P z nowymi inhibitorami.

Dodatkowo, pochodna N-metyloamidowa FMDP mieści się również dobrze w kieszeni syntazy GlcN-6-P wiążącej glutaminy, pomimo że jeden z atomów wodoru zastąpiono grupą metylowa (rys. 18).



Rysunek 18 Oddziaływania drugorzędowego amidu FMDP z aminokwasami centrum aktywnego enzymu syntazy GlcN-6-P

Okazało się, że objętość ugrupowania drugorzędowego amidu może powodować jedynie niewielkie zmiany oddziaływań z enzymem, z zachowaniem wielu istotnych interakcji. Ugrupowanie karbonylowe drugorzędowego amidu nadal tworzy wiązania wodorowe z ugrupowaniem guanidynowym Arg73 i łańcuchem bocznym His86 (O---HN odległość 1,92 i 2,09), zaś pozostała grupa NH tworzy słabe wiązania wodorowe z grupą karboksylową łańcucha bocznego Asp123 (odległości O--HN 2,01). Co ciekawe, zastąpienie w wyniku podstawienia drugiego atomu wodoru grupą metylową powoduje, że wiązanie wodorowe z His77 jest zastąpione oddziaływaniem van der Waalsa grupy metylowej z alifatyczną częścią łańcucha bocznego Thr122 (C--CG2 odległość 3,06). Wiązanie N- metyloamidu FMDP jest słabsze w porównaniu do pierwszorzędowej amidowej pochodnej, co ma swoje odzwierciedlenie w przewidywanej energii swobodnej wiązania, która wzrosła o 1,5 kcal / mol.

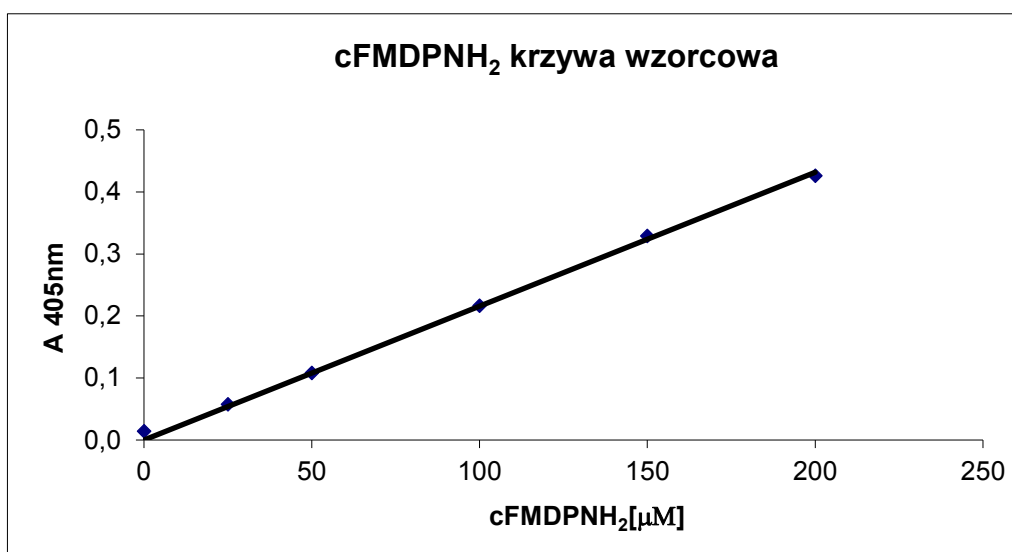
Dokowanie N, N-dimetyloamidu FMDP nie dały spójnych wyników. Wydaje się, że trzeciorzędowy amid, posiadający dwie obszerne grupy metylowe, utrudnia jego wiązanie

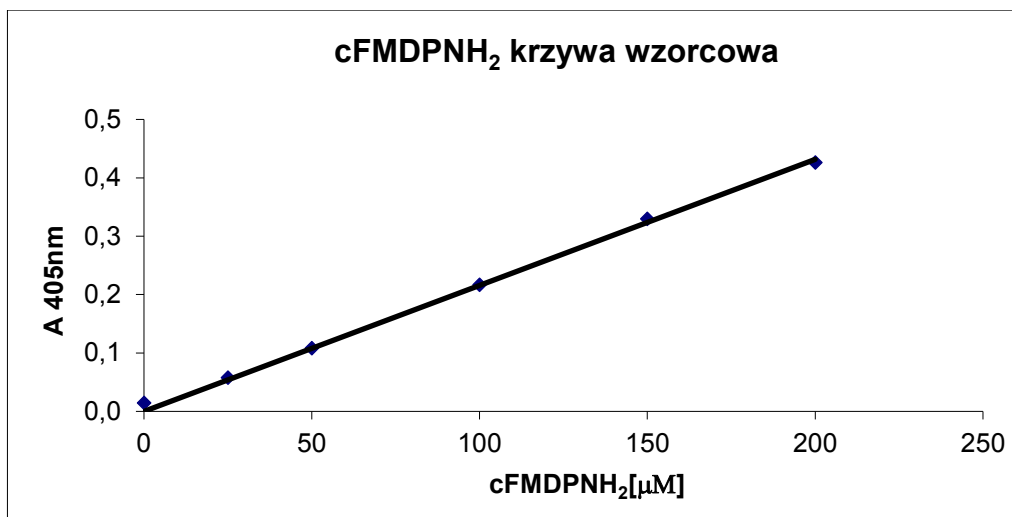
z enzymem w odpowiedniej orientacji, ponieważ nie ma wystarczająco dużo przestrzeni wewnątrz miejsca wiążącego. Ugrupowanie N, N-dimetyloamidu umieszczone jest raczej na zewnątrz kieszeni wiążącej.

Podsumowując, dla amidowych pochodnych FMDP wyniki modelowania potwierdziły wiązanie się nowych związków w centrum aktywnym enzymu, co znalazło swoje odzwierciedlenie we właściwościach biologicznych nowych związków, przedstawionych w postaci IC_{50} i aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

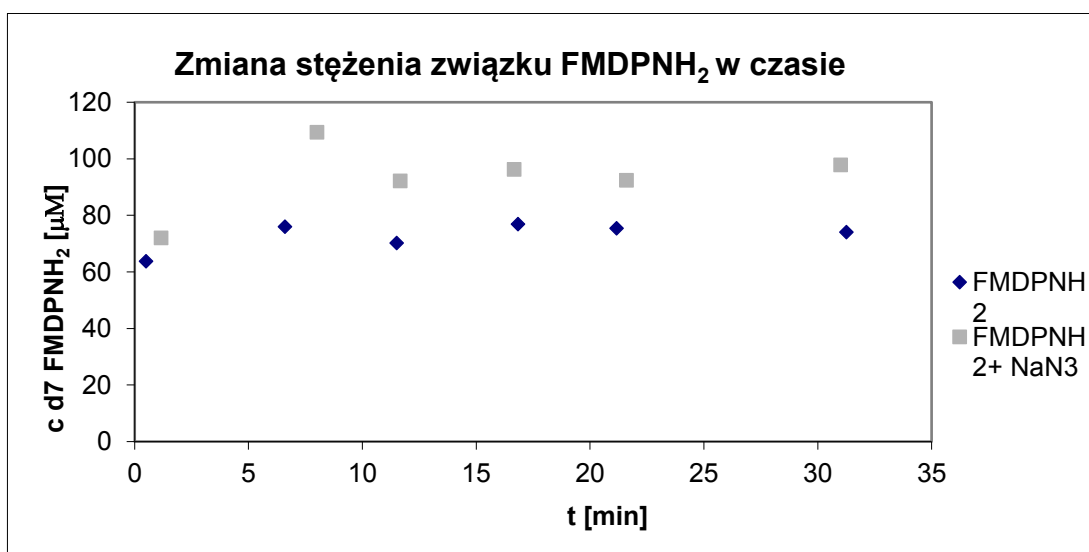
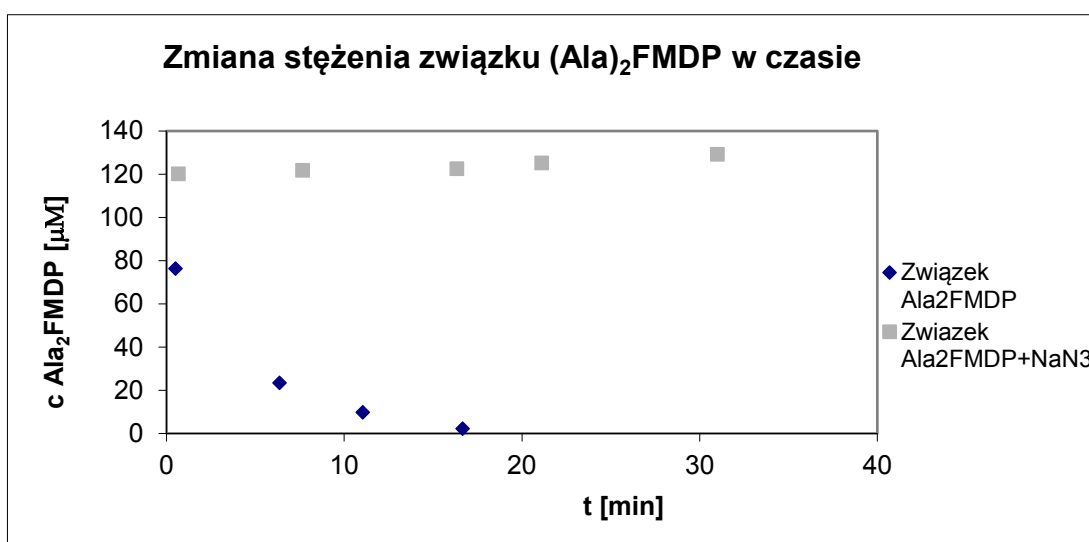
Zaobserwowane wyniki aktywności przeciwdrobnoustrojowej wskazują na hamowanie wzrostu mikroorganizmów należących tylko do szczepu *C. albicans*. Wykazały także, iż amid FMDP (**6**) wykazuje poprawę biodostępności związku dla komórek grzybowych w stosunku do niemodyfikowanego FMDP, co sugerowało sprawdzenie transportu pochodnej do wnętrza komórek.

Dla badanego związku i związku referencyjnego wyznaczono początkowo krzywą wzorcową.





Wyznaczenie zależności stężenia związku od absorbancji w próbkach pozwoliło na interpretację stężenia w próbkach związków. Test przeprowadzono również wobec hodowli z dodatkiem NaN₃, wykluczając możliwość transportu aktywnego w próbce.



Wyniki wskazały na brak zmiany stężenia związku 6 w eksperymencie, co w tym zakresie stężenia oraz czasie eksperymentu wskazuje na bardzo mały transport substancji do komórek.

Badanie transportu amidów FMDP do komórek grzybowych wykluczyło transport aktywny z udziałem permeaz petydowych. Jako związek referencyjny stosowano dipeptyd (Ala)₂ FMDP, który jest transportowany do komórek z udziałem permeaz peptydowych. W przypadku amidu FMDP dodatek NaN₃ (znanego inhibitora transportu z udziałem permeaz peptydowych) nie miał wpływu na szybkość transportu tego amidu do komórek grzybowych.

Wynik eksperymentu wykazuje, że pochodna amidowa nie ulega transportowi aktywnemu przez permeazy peptydowe, co może sugerować przebieg transportu tego związku jedynie przez dyfuzję prostą.

5.4. Syntezy pochodnych estrowych FMDP i BADP oraz określenie ich aktywności biologicznej.

5.4.1. Synteza pochodnych ketoestrowych FMDP i BADP

Do tej pory otrzymano kilka latentnych estrów FMDP oraz ester metylowy. Badania te miały na celu znalezienie nowych inhibitorów enzymu, jak również latentnych modyfikacji poprawiających aktywność przeciwdrobnoustrojową FMDP. Na podstawie wykonanych wcześniej doświadczeń zauważono, że ester metylowy FMDP wykazuje obniżoną zdolność inhibicyjną wobec syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* (IC₅₀=220 μM). W ramach badań nad poszukiwaniem nowych inhibitorów syntazy GlcN-6-P otrzymano kilka estrów latentnych FMDP. Ester acetoksymetylowy GMDP i ester piwaliloksymetylowy FMDP wykazały w porównaniu do estru metylowego FMDP wysoki potencjał inhibicyjny w stosunku do syntazy GlcN-6-P, a także wysoką aktywność przeciwgrzybową. Otrzymane wyniki wskazywały, że związki te są transportowane na drodze dyfuzji.

Dodatkowo zaprojektowana została szeroka grupa latentnych estrów będących koniugatami biny, pełniącymi funkcję proleku dla FMDP. Modyfikacje te miały na celu poprawę transportu związków przez błony biologiczne, przez znaczną poprawę ich lipofilowości. Badania wskazały na skuteczne zmniejszenie hydrofobowości

zapropionowanych analogów, ($\log_{K'_{IAM}} = 0,91:2,11$, gdzie dla FMDP $\log_{K'_{IAM}} = -0,85$) oraz wzrost aktywności w stosunku do niemodyfikowanego FMDP. Otrzymane wartości MIC nie stanowiły obiecujących wyników, nie wskazując na zastosowanie tych pochodnych jako skutecznych leków (wartości MIC od 15,6 do 1000 $\mu\text{g/ml}$).

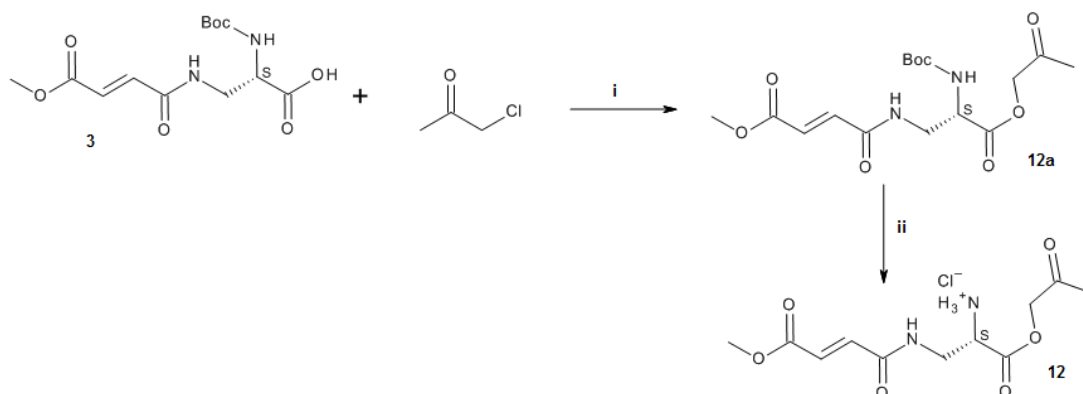
Wyniki dla dotychczas otrzymanych analogów FMDP wskazały na możliwość modyfikacji grupy karboksylowej jako kierunek prowadzący do otrzymania potencjalnych leków przeciwgrzybowych. Efektywnym działaniem może być zwiększanie lipofilowości cząsteczek inhibitora, przez wprowadzenie do grupy estrowej podstawników o niewielkich rozmiarach. Tak modyfikowane cząsteczki inhibitora powinny zachować także właściwości inhibicyjne w stosunku do syntazy GlcN-6-P.

Wymiana grupy karboksylowej na pochodne estrowe jest konwencjonalną metodą przekształcania związków, w celu zwiększenia ich lipofilowości. Strategia ta znajduje zastosowanie w szczególności do tworzenia pochodnych szerokiej grupy leków i związków aktywnych. Literatura prezentuje szeroką gamę metod otrzymywania estrów kwasów karboksylowych. Aminokwasowy charakter inhibitora, obecność labilnych, ugrupowań w cząsteczce FMDP wymaga zastosowania łagodnych metod estryfikacji, w celu otrzymania zaplanowanych związków.

Pierwszy z kierunków badań zakładał syntezę związków, które swoją strukturą będą zbliżone do otrzymanej wcześniej grupy acetoksyestrów.⁸⁶ Sposób modyfikacji obejmował syntezę pochodnych estrowych FMDP, zawierających w swojej strukturze grupę karboksylową.

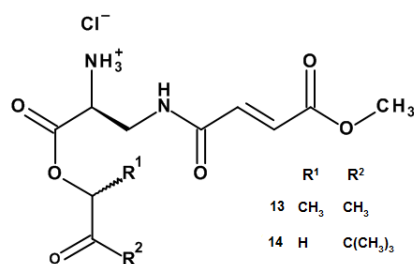
Próba syntezy połączenia Boc-FMDP z halogenoketonem opierała się na zasadzie reakcji substytucji nukleofilowej, przez atak anionu karboksylowego Boc-FMDP na atom węgla podstawiony chlorowcem, znajdujący się w pozycji α do grupy karbonylowej. Metoda ta polega na potraktowaniu kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-(N^3 -(4-metoksyfumaroylo)-(S)-2,3-diaminopropanowego rozpuszczonego w THF, równomolową ilością trietyloaminy. Otrzymany w tych warunkach anion karboksylanowy podstawia atom chlorowca w cząsteczce chloroacetonu. Słaby postęp reakcji sugerował modyfikacje tej metody w celu poprawy jej wydajności. Dodatek katalitycznej ilości jodku potasu znacznie poprawił wydajność reakcji. Synteza przebiegła w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Produkt reakcji wymagał oczyszczenia z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej, a po oczyszczeniu związek został dodatkowo krystalizowany z eteru

dietylowego. Po usunięciu grupy zabezpieczającej, związek poddany został badaniom *in vitro* wobec szczepu *C. albicans*.



Rysunek 19 Schemat syntezy estru acetylometylowego FMDP. (i- NEt_3/THF , 24h , ii-HCl/dioksan, 3h)

Zadowalająca wydajność otrzymanego produktu oraz wstępny wynik aktywności przeciwdrobnoustrojowej estru acetylometylowego FMDP wskazał na kierunek syntezy innych ketoestrowych analogów tego inhibitora syntazy glukozyamin-6-fosforanu.



Rysunek 20 Schemat estrów FMDP otrzymanych w reakcji FMDP z 3-chloro-butan-2-onem (13) i z chloropinakolonem (14)

Początkowo podjęto próbę połączenia Boc-FMDP z 3-chloro-2-butanonem. Zastosowana w tym przypadku analogiczna procedura, jak dla związku 12, wskazywała na słaby postęp reakcji. Wydłużenie czasu reakcji do 72 godzin oraz oczyszczenie produktu za pomocą chromatografii kolumnowej i krystalizacji, pozwoliło na otrzymanie związku z zadowalającą wydajnością.

Przedstawiona strategia syntezy pochodnych ketoestrowych inhibitora FMDP wykorzystana została również do reakcji BocFMDP z chloropinakolonem. Wydłużony czas syntezy nie wskazywał na powstawanie satysfakcjonującej ilości produktu. Opisana reakcja przebiega według mechanizmu $\text{S}_{\text{N}}2$. Szybkość tej reakcji zależy w znacznym stopniu od zawady sterycznej substratu, która może znacząco utrudniać przebieg reakcji. Występowanie w cząsteczce substratu *tert*-butylowego podstawnika może istotnie

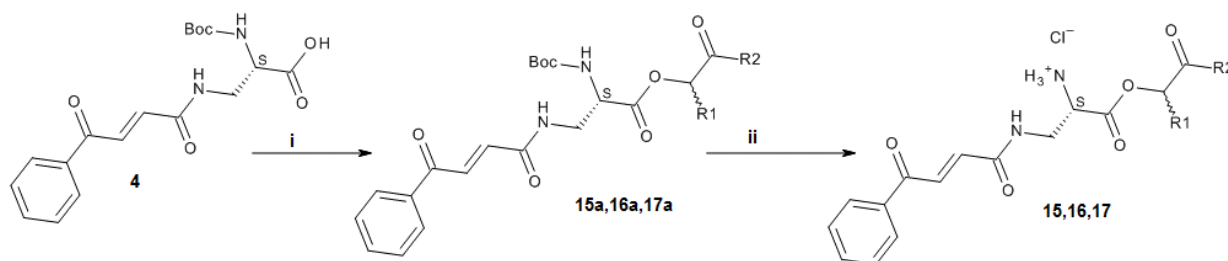
wpływać na szybkość reakcji. Dodatkowo ze względu na rozpuszczalność Boc-FMDP jako rozpuszczalnik stosuje się THF, a dla reakcji substytucji dwucząsteczkowej preferowane są rozpuszczalniki aprotyczne o polarnym charakterze, jak aceton, acetonitryl, DMF oraz DMSO. Dlatego zaplanowano modyfikację metody przez wykorzystanie innego rozpuszczalnika.

Poszukiwana procedura syntezy miała spełniać warunki reakcji chemicznej przebiegającej w warunkach łagodnych zmian pH czy w niezbyt wysokiej temperaturze. Takie podejście gwarantuje ochronę cząsteczek inhibitora przed degradacją czy zajściem reakcji ubocznych. Synteza estru 3,3-dimetylo-2-okso-butyloвого kwasu N²-tert-butoksykarbonilo-N³-(4-metoksyfumaroilo)-S-2,3-diaminopropanowego została przeprowadzona w sposób analogiczny do metody zastosowanej w syntezie enkefaliny.⁸⁷

Metoda opiera się na miareczkowaniu roztworu kwasu za pomocą węgla cezu, z utworzeniem soli cesowej, którą to następnie poddaje się reakcji z halogenoalkanem w roztworze DMF. Ten sposób syntezy estrów jest szybki, łatwy w wykonaniu, nie stanowi problemu zwiększenie skali, a także nie prowadzi do racemizacji związków. Procedura ta jest często wykorzystywana do modyfikacji peptydów i aminokwasów.⁸⁸

Metoda syntezy estrów przy użyciu węgla cezu została wykorzystana również do otrzymania połączeń Boc-FMDP z chloropinakolonem. Substrat ten jest związkiem toksycznym oraz silnym lakrymatorem. Otrzymane według schematu związki 15-17a wymagały oczyszczenia poprzez chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym, a dodatkowo były krystalizowane z mieszaniny octan etylu:heksan.

Ze względu na zadowalającą skuteczność tej metody w syntezie estrów z BocFMDP, poprzez zastosowanie soli cesowej, przeprowadzono reakcje analogiczne Boc BADP z chloroacetonem, 3-chloro-2-butanonem oraz chloropinakolonem.



Rysunek 21 Schemat syntezy pochodnych ketoestrowych z BADP (i-1. Cs₂CO₃/MeOH, H₂O, 2. R²CO(R¹)CH₂Cl/DMF, 72h; ii-HC/dioksan, 3h)

Chromatografia kolumnowa produktów reakcji pozwoliła na izolację i uzyskanie oczekiwanych analogów BADP.

W toku badań zaplanowano otrzymanie pochodnych ketoestrowych o dłuższym łańcuchu alifatycznym. W reakcjach zastosowano substrat dodatkowo zawierający atom chlorowca, podstawiony na innym atomie węgla niż pozycja α do grupy karbonylowej. Zastosowaniem soli cesowej lub trietyloamoniowej BocFMDP w reakcji z 5-chloro-2-pentanonem nie prowadziło do satysfakcjonującej wydajności reakcji.

Badany za pomocą analizy TLC przebieg reakcji wskazywał na praktycznie znikomą ilość powstającego produktu. Dlatego zaproponowano inną metodę syntezy z halogenoalkilami, która prowadziła do otrzymania oczekiwanego produktu. Postanowiono zastosować procedurę, która z powodzeniem stosowana była wcześniej do otrzymywania latentnych estrów acetoksymetylowych FMDP.⁸⁹

Reakcję Boc-FMDP z halogenoketonem prowadzono w benzenie, z DBU jako zasadą oraz katalityczną ilością jodku sodu.⁹⁰ Całość była ogrzewana w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 8 godzin, a w trakcie syntezy postęp reakcji był kontrolowany za pomocą chromatografii TLC. Wraz z czasem reakcji obserwowano niewielką ilość powstającego produktu, a po dłuższym czasie nie było widoczne zwiększanie się jego ilości, natomiast widoczny był ubytek ilości Boc-FMDP oraz zwiększające się ilości związków, świadczące o degradacji substratu.

Dane literaturowe wskazują, iż stosowanie w reakcji jodków alkilowych prowadzi do zwiększenia wydajności. Można przypuszczać, że katalityczna ilość jodku sodu była niewystarczająca, aby wpłynąć na postęp reakcji.

Kolejna próba syntez ketoestrowego analogu FMDP polegała na przeprowadzeniu cząsteczki chloroketonu w odpowiedni jodoketon. Związek ten zastosowano w reakcji estryfikacji z Boc-FMDP, jednakże dłuższy czas syntezy nie wskazywał na jej postęp. Natomiast wyizolowany produkt po oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej otrzymany został w zbyt małej ilości, aby możliwe było usunięcie grupy zabezpieczającej *tert*-butoksykarbonylowej czy dalsze badanie aktywności, przez co zrezygnowano z tej ścieżki syntezy nowej pochodnej.

Przekształcenie 5-jodo-2-pentanonu w odpowiedni ketoalkohol i wykorzystanie alkoholu do syntezy ketoestrowej pochodnej FMDP zostało zaproponowane jako alternatywna metoda syntezy. Jednak przekształcenie halogenoketonu do alkoholu,

za pomocą wody i dodatku HMPA, nie dało pozytywnego wyniku ze względu na możliwość wewnątrzcząsteczkowych reakcji.

5.4.2. Omówienie wyników aktywności biologicznej ketoetrów FMDP i BADP

Grupa ketoestrowych pochodnych FMDP w teście aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykazała obiecujące wyniki wartości MIC₈₀. Wyraźnie zaobserwowano hamowanie wzrostu drobnoustrojów grzybowych, głównie szczepu *C. albicans*. W zakresie wysokich stężeń obserwuje się także zahamowanie wzrostu dla innych grzybów z rodzaju *Candida*.

Jako związek referencyjny w teście aktywności przeciwdrobnoustrojowej zastosowano pochodną peptydową FMDP: NvaFMDP, która jest najbardziej aktywną pochodną FMDP. Nowe ketoestrowe analogi pomimo obiecującej aktywności przeciwgrzybowej nie wykazały silniejszego efektu niż dipeptyd Nva FMDP, choć reprezentują bardziej obiecujące wyniki aktywności niż niemodyfikowany FMDP.

Związek	MIC ₈₀ [µg/ml]							
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i>	<i>C.</i> <i>parapsilosis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.</i> <i>epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>
12	0,25	512	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>.1024
13	0,5	512	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
14	0,5	512	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
15	>1024	>1024	>1024	nb	nb	Nb	nb	nb
16	>1024	>1024	>1024	nb	nb	Nb	nb	nb
17	512	256	256	nb	nb	nb	nb	nb
Nva-FMDP	0,25	8	8	>1024	128	>1024	>1024	>1024

Tabela 4 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ketoestrowych pochodnych FMDP i BADP.

Dodatkowo można zauważyć, że pochodne ketoestrowe BADP nie wykazały aktywności. Jedynie w przypadku pochodnej 17 zaobserwowano słabe hamowanie wzrostu komórek grzybów przy zastosowaniu wysokiego stężenia związku. Ze względu na trudną rozpuszczalność związku, do wyznaczenia wartości IC₅₀ zastosowano dodatek DMSO. W doświadczeniu tym związek 17 wykazywał inhibicję enzymu syntazy glukozamino-6-fosforanu w bardzo wysokim zakresie stężeń, co świadczy o aktywności przeciwdrobnoustrojowej niezależnej od mechanizmu bezpośredniej inhibicji enzymu.

Dodatkowo wykonano doświadczenie z dodatkiem do pożywki N-acetyloglukozaminy, gdzie zaobserwowano dla tego związku brak zmiany aktywności. Potwierdza to przypuszczenie, iż za aktywność związku nie odpowiada oddziaływanie z enzymem.

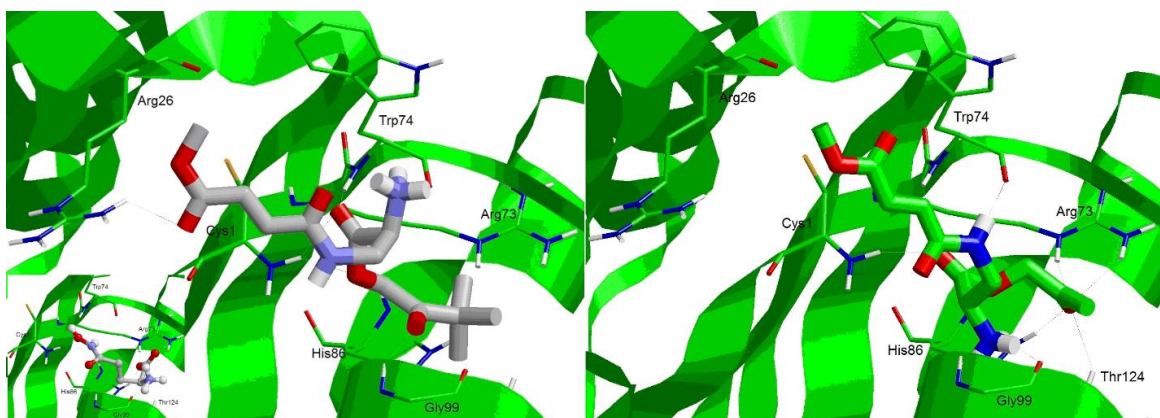
Związek	RPMI		YNB-SA		YNB-SA + NAG	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
17	2048	2048	512	1024	512	1024
Nva-FMDP	8	16	0,25	0,5	>16	>16

Tabela 5 Wyniki aktywności związku 17 w podłożu RPMI oraz minimalnym z dodatkiem NAG

Wysoka aktywność pochodnych w testach *in vitro* wobec szczepu *C. albicans* wykazuje powiązanie z wartością IC₅₀ nowych pochodnych. Jak prezentują przedstawione w tabeli 5 dane, największą zdolność do hamowania aktywności enzymu wykazują pochodne FMDP, przy czym wartość IC₅₀ nie odbiega znacząco od wartości wyznaczonej dla samego FMDP. W przypadku pochodnych BADP, wartości IC₅₀ również przewyższyły wartość IC₅₀ niemodyfikowanego inhibitora, i były o dwa rzędy wielkości większe niż dla pochodnych FMDP.

Związek	IC ₅₀ [mM]
12	0,0051 ±0,0001
13	0,00491±0,0004
14	0,0052±0,00013
15	0,314±0,035
16	0,309±0,007)
17	2,673±1,281 (rozp. w DMSO)
FMDP	0,004±0,0002
BADP	0,256±0,0027

Wysoki potencjał inhibicyjny ketoestrowych pochodnych FMDP potwierdzają również wyniki badań z wykorzystaniem modelowania molekularnego.



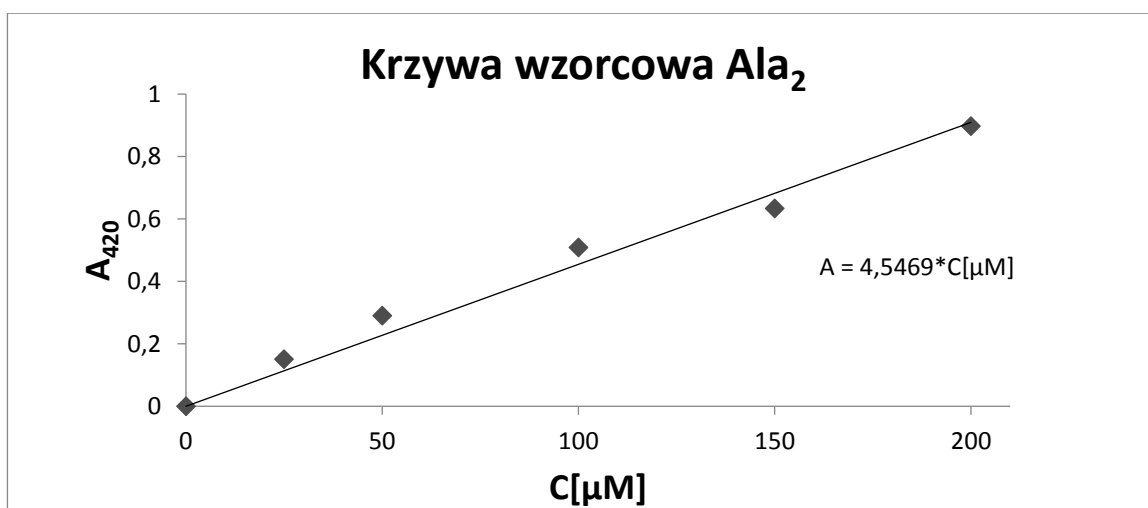
Rysunek 22 Oddziaływania ketoestrowych pochodnych FMDP z centrum aktywnym syntazy GlcN-6-P

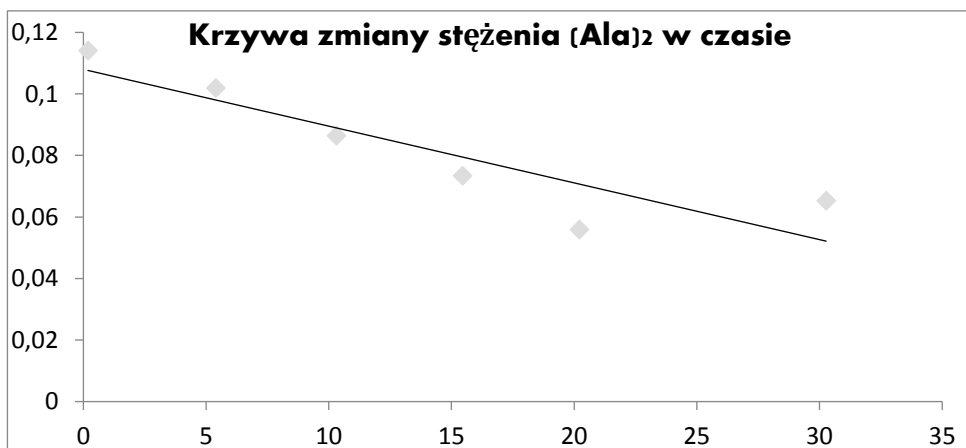
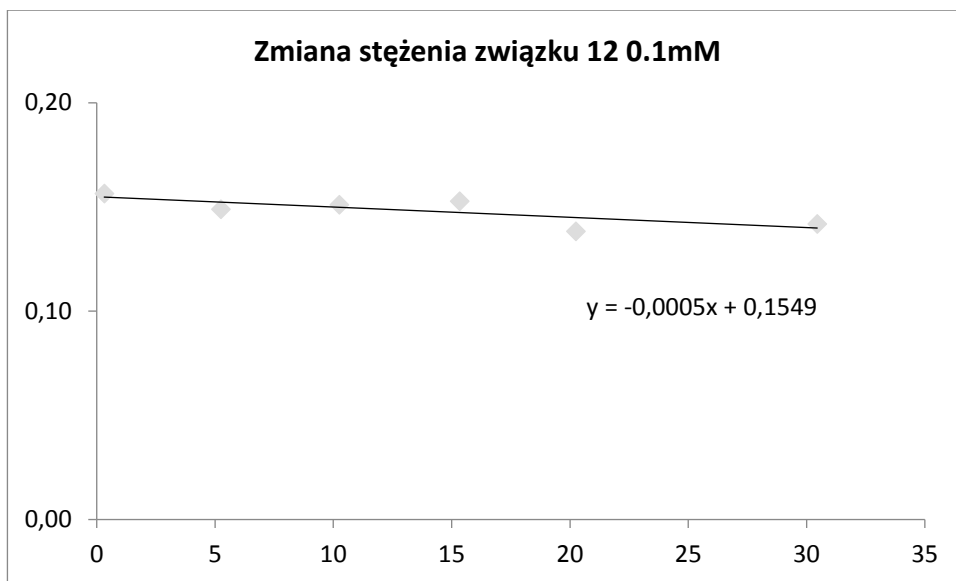
Inhibitory syntazy glukozamino-6-fosforanu, jako analogi glutaminy, mają podobne cechy strukturalne, a w konsekwencji podobny sposób wiązania wewnątrz kieszeni wiążącej enzymu. Do interakcji grup funkcyjnych cząsteczki inhibitora z centrum aktywnym należą: oddziaływania grupy hydroksylowej w cząsteczce inhibitora z Arg73 i His86, grupy aminowej inhibitora z Gly99 i Thr76 oraz interakcję grupy amidowej z Gly99 i Trp74. Związki 12, 14 zaprojektowane i przedstawione w niniejszej pracy wykazują w tym zakresie odmienne oddziaływania.(rys. 22).

Estryfikacja grupy karboksylowej FMDP prowadzi do znacznego powiększenia tej części inhibitora. W związku 12 podstawnik estrowy znajdujący się w miejscu grupy karboksylowej inhibitora powoduje zmianę ułożenia tej pochodnej w centrum aktywnym enzymu. W konsekwencji grupa fumaroilowa ligandu jest przesunięta poza kieszeń wiążącą, w kierunku hydrofobowego kanału łączącego dwa miejsca wiązania enzymu. Obecność dodatkowej karbonylowa odtwarza interakcję grupy karboksylowej inhibitora tworzącej wiązania wodorowe z Arg73, His86 i Thr124. Grupa aminowa związku, pomimo znacznego przesunięcia, nadal jest w stanie tworzyć wiązania wodorowe z Gly99 i grupy karbonylową His97. Z drugiej strony, estryfikowana grupa karboksylowa może oddziaływać z wolną grupą aminową Cys 1 . Efekt ten jest podkreślony w przypadku pochodnej 14, zawierającej duży podstawniki, *tert*-butylowy, który wyróżnia utrudnione dopasowanie w kieszeni wiążącej. Grupą karbonylowa tego ligandu jest przesuwana jeszcze bardziej w kierunku miejsca interakcji z grupą aminową Gly99. W wyniku przesunięcia związku nie tylko estryfikowana grupa karboksylowa mieści się w zakresie 2 nm do Cys1, a także grupa 4- metoksylofumaroylowa przybliżyła się do Arg26 i tworzy wiązania wodorowe z grupą guanidynową.

Istotna zmiana oddziaływań nowych pochodnych spowodowała, że podwójne wiązanie w ugrupowaniu fumaroilowym znajduje się blisko grupy tiolowej Cys1, pozwalając na zapoczątkowanie wiązania kowalencyjnego między tymi dwoma grupami funkcyjnymi. Ta obserwacja wyjaśnia wysoką aktywność związków 12 i 14 mimo, że nie mają one wolnej grupy karboksylowej, pełniącej funkcję „kotwicy” wewnątrz miejsca wiązania inhibitorów w centrum aktywnym syntazy glukozy-6-fosforanu.

Interesujące wyniki aktywności biologicznej związków 12-14, wskazały na poprawę biodostępności tych pochodnych. Badanie transportu związku przez błonę cytoplazmatyczną *C. albicans* wybrano pochodną 12. W doświadczeniu jako kontrolę użyto dipeptydu Ala-Ala, który jest dobrze transportowany do komórki grzybowej przez permeazy peptydowe. Struktura chemiczna związku 12 jest zbliżona do struktury molekulej estru acetoksymetylowego FMDP, która jest transportowana do komórek na drodze dyfuzji prostej.





Zaobserwowany w tym przypadku nieznaczny spadek ilości związku 12 wskazuje na nieznaczny transport substancji do wnętrza komórki.

5.5. Syntezy koniugatów FMDP i BADP z hydroksyamidami oraz ich właściwości biologiczne.

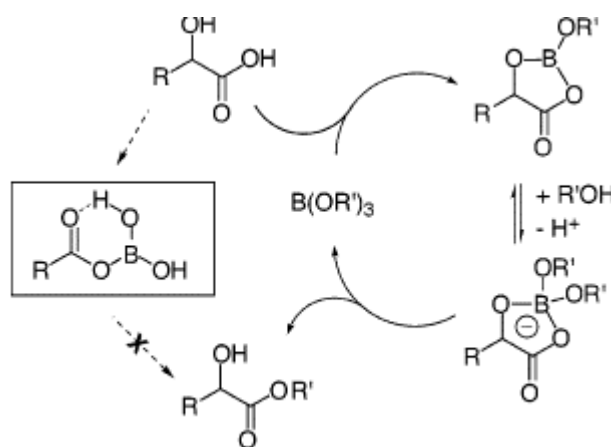
5.5.1. Syntezy koniugatów FMDP i BADP z hydroksyamidami

Jedną z koncepcji tworzenia aktywnych pochodnych FMDP i BADP dotyczyła utworzenia ich estrowych koniugatów z cząsteczkami niewielkich amidów. W literaturze amidy kwasu glikolowego zostały opisane jako nowe systemy leków. N-podstawione amidy kwasu glikolowego, zawierające podstawniki alkilowe, zostały również zbadane jako substancje przeciwdrobnoustrojowe, o działaniu przeciwegruźliczym⁹¹. Interesującym sposobem modyfikacji FMDP okazało się zastąpienie grupy karboksylowej podstawnikiem



glikolamidowym niewielkiej objętości. Stworzenie estrowego koniugatu może wpływać na oddziaływania takich związków z centrum aktywnym enzymu.

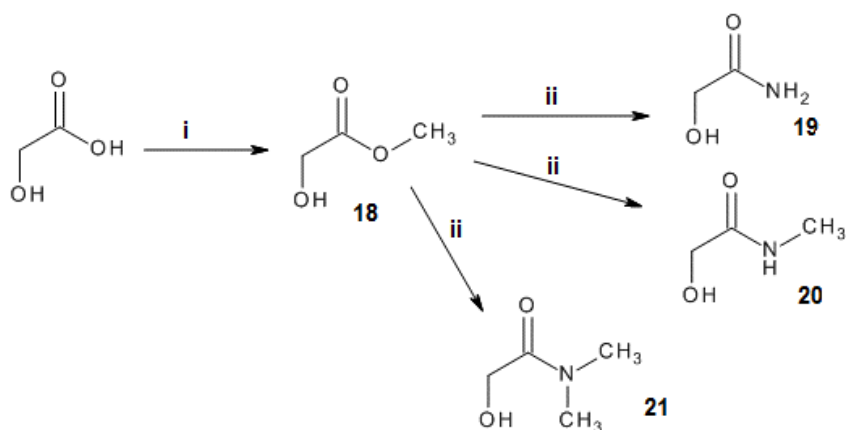
Syntezy koniugatów wymagały otrzymania amidu i N-alkiloamidów kwasu glikolowego. Aktywację grupy karboksylowej wykonano przez estryfikację alkoholem metylovym w obecności chlorku tionylu. Ta metoda syntezy pozwoliła na otrzymanie esteru metylovego kwasu glikolowego z niezadowalającą wydajnością. W celu uzyskania większej ilości estru kwasu glikolowego zastosowano drogę syntezy, w której jako katalizatora użyto kwasu borowego. Metoda ta pozwala na otrzymywanie estrów α -hydroksykwasów zgodnie z zaprezentowanym schematem.



Rysunek 23 Mechanizm reakcji otrzymywania estrów kwasu glikolowego(lit)

Wykorzystanie tej metody reakcji pozwala otrzymać estry kwasu glikolowego z wysokimi wydajnościami, a oczyszczenie produktu można wykonać w prosty sposób za pomocą destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem.^{92,93}

Otrzymany ester metylovym poddano następnie reakcjom aminolizy, co pokazano na rysunku 24.⁹⁴

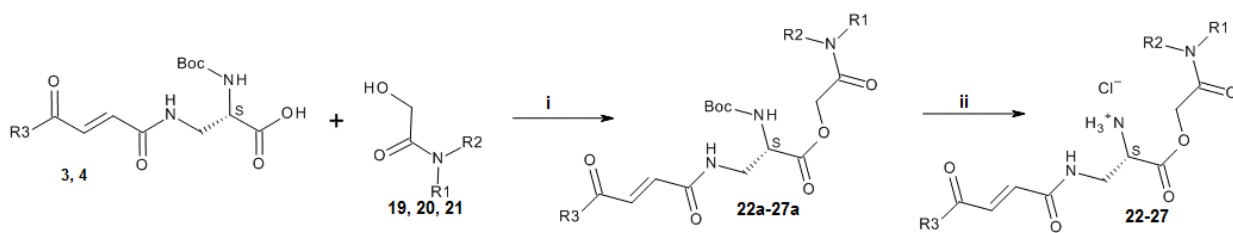


Rysunek 24 Schemat syntezy estru metylowego kwasu glikolowego i odpowiednich glicynamidów (i- B(OH)₃/MeOH, 20h; ii- [23,9% NH₃/MeOH (19), 40% CH₃NH₂/H₂O (20) lub 40% NH(CH₃)₂/H₂O (21)],/THF, 6-24h

Początkowo sprzężanie Boc-FMDP z glikolamidem przeprowadzono z wykorzystaniem dicykloheksylokarbodiimidu, jako odczynnika aprzegającego. Związek 22a po oczyszczeniu za pomocą chromatografii kolumnowej otrzymano w formie krystalicznego związku.

Syntezy koniugatów z glikolamidami z wykorzystaniem odczynnika sprzęgającym DCC zaprezentowano w literaturze. W syntezie zastosowano także DMAP w ilości katalitycznej, a jako rozpuszczalnik CH₂Cl₂.⁹⁵

Zastosowanie tej procedury do glikolamidowych modyfikacji FMDP i BADP pozwoliło na znaczne skrócenie czasu syntezy do 6 godz. Reakcje były przeprowadzone według schematów



Rysunek 25 Schemat syntezy glicynamidów FMDP i BADP (i-DCC/dioksan (22a) lub DCC/DMAP/THF (24a) lub DCC/DMAP/CH₂Cl₂ (23a-26a), 6-24h; ii- HC/dioksan, 3h

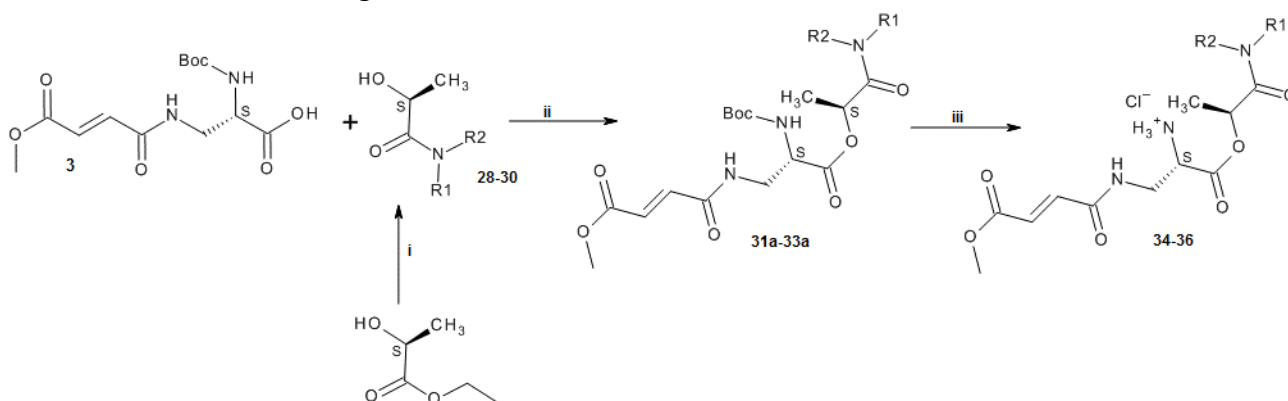
Metoda syntezy z dodatkiem DMAP pozwoliła na wyeliminowanie zanieczyszczeń, trudnych do usunięcia przy pomocy chromatografii kolumnowej. Produkt oczyszczono przez odsączenie osadu DCU i płukaniem warstwy organicznej wodą i roztworami NaHSO₄ i NaHCO₃, tylko część preparatów wymagała dodatkowego oczyszczanie przez

chromatografię kolumnową, a produkty występowały w postaci krystalicznej. Usunięcie grupy zabezpieczającej Boc wykonano standardowo za pomocą 4N HCl w dioksanie.

Otrzymana grupa koniugatów FMDP z amidem, N-metylo i N,N-dimetyloamidem kwasu glikolowego wykazywała znaczną aktywność przeciwgrzybową. Zatem w kolejnym etapie badań zaplanowano otrzymanie połączenie FMDP z amidami kwasu L-mlekowego.

Kwas mlekowy to jeden z związków naturalnych o szerokim występowaniu i działaniu. Ze względu na obecność grup karboksylowej i hydroksylowej znalazł szerokie zastosowanie w produkcji biodegradowalnych polimerów.⁹⁶ Obecność tych dwóch grup funkcyjnych daje duże możliwości polimeryzacji czy modyfikacji. Fakt ten zastał wykorzystany do produkcji zmodyfikowanych form leków w tym także proleków, ponieważ połączenia estrowe charakteryzują się możliwością hydrolizy w układach biologicznych.⁹⁷ W komórkach niektórych grzybów obecne są także permeazy transportujące niższe kwasy karboksylowe do wnętrza komórek, w tym także kwas mlekowy, zatem takie połączenia z tym związkiem mogą stworzyć nowy system transportujący.^{98, 99}

Syntezę koniugatów laktamidów z FMDP należało rozpocząć od syntezy 3 różnych amidów kwasu mlekowego.¹⁰⁰



Rysunek 26 Schemat syntezy estrowych koniugatów FMDP z L-laktamidami. (i-23,9% NH₃/MeOH (28), 40% CH₃NH₂/H₂O (29) lub 40% NH(CH₃)₂/H₂O (30); ii-DCC/DMAP/CH₂Cl₂, 24h; iii- HCl/ dioksan, 3h.

L-mleczanu etylu traktowano roztworem odpowiedniej aminy, a reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24h. Po zakończeniu reakcji pozostałości substratów i rozpuszczalnik zostały odparowane pod zmniejszonym ciśnieniem, a w następnym etapie syntezy produkt był wykorzystany w formie oleju, tylko w przypadku N,N-dimetylolaktamidu udało się uzyskać produkt krystaliczny.

Kolejny etap syntezy obejmował połączenie otrzymanych laktamidów z cząsteczką FMDP i został przedstawiony na rysunku 19. Reakcja sprzęgania przeprowadzona została w analogiczny sposób, jak w przypadku otrzymywania koniugatów FMDP z glikolamidami. Produkty reakcji zostały oczyszczone przez ekstrakcję i krystalizację z octanu etylu i heksanu.

5.5.2. Aktywność biologiczna koniugatów FMDP i BADP z hydroksyamidami

Poniżej przedstawiono zestawienie wyników aktywności przeciwdrobnoustrojowej koniugatów glikolamidowych z FMDP i BADP oraz serii koniugatów laktamidowych z FMDP. Ze względu na najbardziej obiecujące wyniki aktywności biologicznej koniugatów FMDP, pozostałe pochodne zostały otrzymywane tylko dla tego inhibitora. Podobnie, jak dla serii amidowych i ketoestrowych pochodnych, korzystniejsze właściwości hamujące wzrost u mikroorganizmów wykazują pochodne FMDP. Najmniejsze wartości MIC wykazują związki wobec szczepu *C. albicans*. Zaobserwowano, iż pochodne glikolamidowe FMDP wykazują najkorzystniejsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe, jednakże dużo słabsze niż referencyjny związek NvaFMDP.

Wśród pochodnych glikolamidowych FMDP najniższą aktywność zaobserwowano w przypadku niepodstawionej pochodnej glikolamidowej, natomiast związki z podstawnikiem N-metylowym i N,N-dimetylowym wykazały podobne wartości MIC. Natomiast w przypadku pochodnych laktamidowych wraz ze wzrostem ilości podstawników metylowych na amidowym atomie azotu spada aktywność przeciwgrzybowa. Związki z tej grupy 34-36 wykazały zdolność do hamowania wzrostu jedynie mikroorganizmów ze szczepu *C. albicans*.

Związek	MIC ₈₀ [µg/ml]							
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i>	<i>C.</i> <i>parapsilosis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.</i> <i>epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>
22	128	512	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
23	1	512	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
24	2	512	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
25	>1024	>1024	>1024	Nb	nb	nb	nb	nb
26	>1024	>1024	>1024	Nb	nb	nb	nb	nb
27	>1024	>1024	>1024	Nb	nb	nb	nb	nb
34	8	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
35	16	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
36	256	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Nva-FMDP	0,25	8	8	>1024	128	>1024	>1024	>1024

Tabela 6 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa koniugatów estrowych FMDP i BADP z hydroksyamidami.

Badania wpływu podstawników na zdolność związków do inhibicji enzymu syntazy glukozamino-6-fosforanu przeprowadzono w teście *in vitro* i zaobserwowano wyraźne zahamowanie aktywności enzymu wśród dwóch glikolamidowych pochodnych FMDP. Wyniki te wyraźnie korelują z wynikami testu aktywności przeciwdrobnoustrojowej, jednak związki te okazują się być słabszymi inhibitorami niż niemodyfikowany inhibitor. Pochodne BADP również okazały się słabymi inhibitorami. Ciekawe właściwości wykazały laktamidowe pochodne. Mimo słabej inhibicji enzymu, zaobserwowano przeciwdrobnoustrojowe właściwości tych pochodnych wobec *C. albicans*, co może wskazywać, na inny mechanizm działania niż hamowanie aktywności syntazy GlcN-6-P.

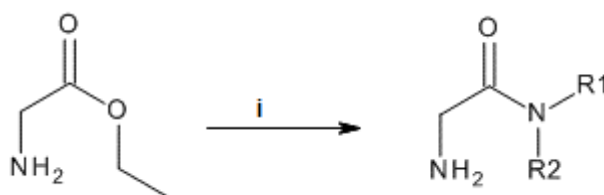
Związek	IC ₅₀ [mM]
22	0,202±0,021
23	0,026±0,0004
24	0,066±0,004
25	0,465±0,021
26	0,432±0,042
27	0,496±0,113
34	0,821±0,003
35	0,199±0,003
36	>5
FMDP	0,004±0,0002
BADP	0,256±0,0027

Tabela 7 Aktywność inhibicyjna koniugatów FMDP i BADP z amidami hydroksywaksów

5.6. Syntezy koniugatów FMDP z glicynamidami i L-alaninamidami oraz badania aktywności biologicznej

5.6.1. Syntezy glicynamidów i L-alaninamidów FMDP

Syntezy koniugatów peptydowych z amidami glicyny wymagały w pierwszym etapie otrzymania pochodnych amidowych kwasu aminooctowego. Do otrzymania glicynamidów początkowo zaplanowana została synteza poprzez aminolizę estru etylowego glicyny.



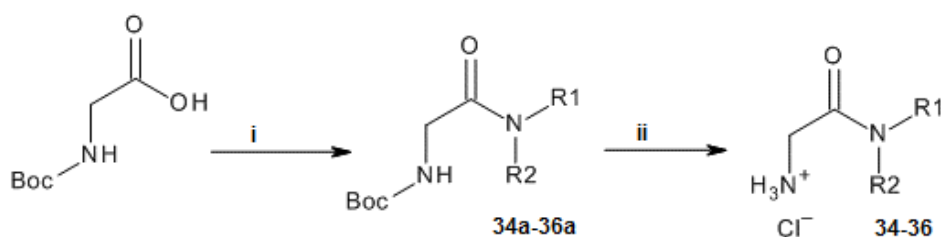
Rysunek 27 Schemat syntezy amidów glicyny. i-NH₃ w MeOH/THF

Aminoliza prowadzona poprzez potraktowanie estru roztworem amoniakiem w metanolu skutkowała pojawieniem się produktów ubocznych reakcji. Oczyszczenia

produktu reakcji poprzez chromatografię jonowymienną nie przyniosły oczekiwanego skutku, zatem zrezygnowano z tej metody otrzymywania glicynamidów.

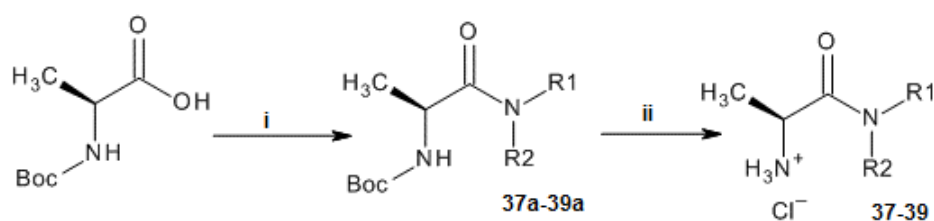
Do syntezy amidów glicyny wykorzystano glicynę chronioną grupą zabezpieczającą *tert*-butoksykarbonylową. Grupę karboksylową przeprowadzono w mieszanym bezwodniku, który w reakcji aminolizy przeprowadzono w odpowiednie amidy glicyny zgodnie ze schematem, który przedstawiono na rysunku 27.

Tert-butoksykarbonyloglicynę przeprowadzono z chloromrówczanem izobutyli w obecności *N*-metylomorfoliny w mieszanym bezwodniku, który następnie traktowano, jak w przypadku syntezy amidów FMDP i BADP odpowiednimi aminami. Produkty reakcji oczyszczone zostały przez ekstrakcję oraz krystalizację. Ostatnim krokiem przed podjęciem dalszej syntezy było usunięcie z grupy aminowej grupy zabezpieczającej Boc, poprzez użycie HCl w dioksanie.



Rysunek 28 Schemat syntezy amidów glicyny. I-1. *N*-metylomorfolina, chloromrówczan *sec*-butylu, THF, -10°C, 10min; 2. NH₃/MeOH (34a); CH₃NH₂/H₂O (35a); NH(CH₃)₂/H₂O (36a); 24h; ii -HCl/dioksan, 3h

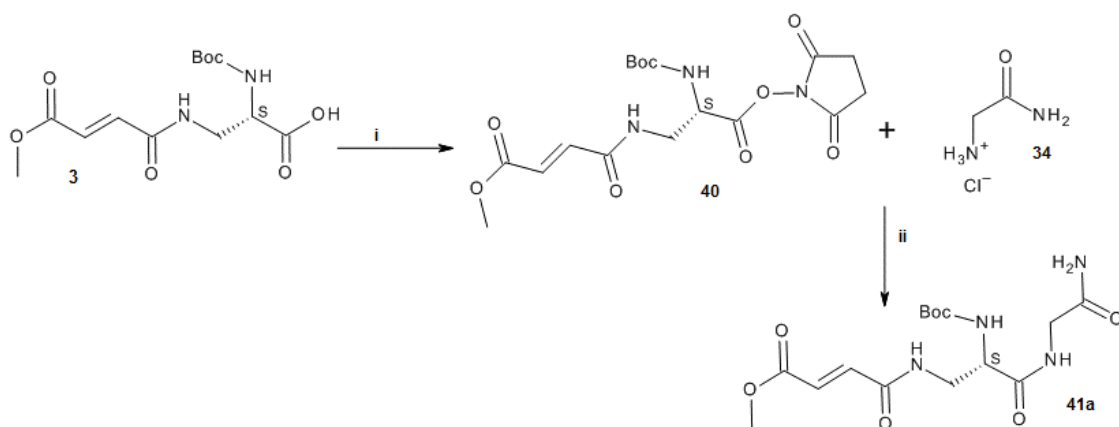
Analogiczna metoda została zastosowana do otrzymywania amidów *L*-alaniny zgodnie z zaprezentowanym na rysunku 29



Rysunek 29 Schemat syntezy amidów *L*-alaniny metodą mieszanych bezwodników.

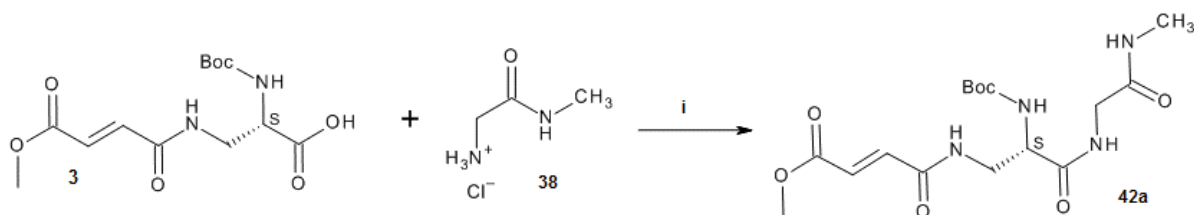
W celu uzyskania koniugatów FMDP z glicynamidami wykorzystano metodę opisaną wcześniej do syntezy amidów FMDP. Jednak ilość otrzymanego związku 41a po reakcji prowadzonej według metody mieszanych bezwodników była niezadowalająca.

Jako alternatywną drogę syntezy dla związku 41a zaplanowano reakcję z wykorzystaniem estru aktywnego *N*-hydroksysukcynoimidowego BocFMDP, co doprowadziło do poprawy wydajności.



Rysunek 28 Schemat syntezy koniugatu FMDP glicynamidem. I-DCC/HOSu,

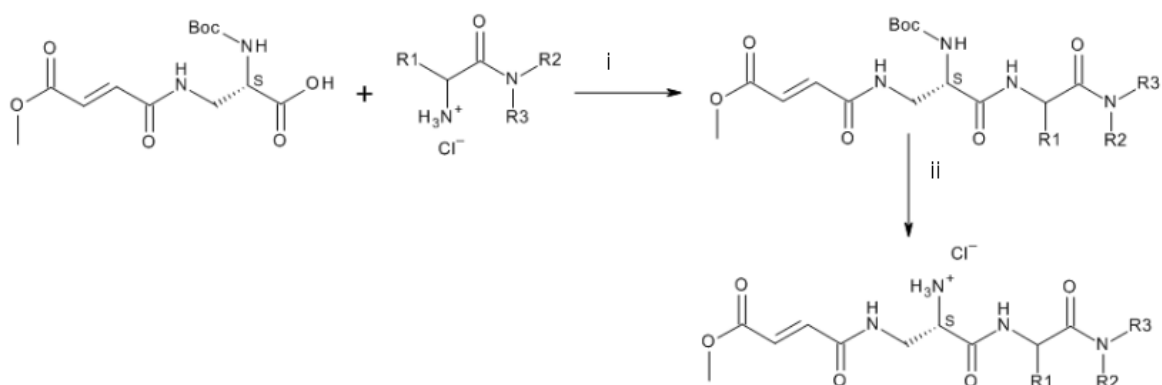
Sprawdzona została także inna metoda sprzęgania z użyciem EDC i HOBT, ale wydajność tej metody była także niezadowalająca.



Rysunek 29 Schemat syntezy koniugatu FMDP z *N*-metyloglicynamidem

Analiza wszystkich przeprowadzonych reakcji oraz kolejnych etapów oczyszczania, wykazała znaczną rozpuszczalność produktu syntezy w wodzie co utrudniało ich wyodrębnienie z fazy wodnej z wykorzystaniem ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi.

Tradycyjna metoda syntezy z wykorzystaniem krystalicznego estru aktywnego, dała rezultaty najbardziej satysfakcjonujące i umożliwiające przeprowadzenie badań biologicznych. Związki przed badaniem w testach *in vitro* zostały przeprowadzone w odpowiednie chlorowodorki, z użyciem HCl/dioksan.



Rysunek 30 Schemat syntezy koniugatów FMDP z L-alaninamidami

Zgodnie z tą strategią z pozytywnymi wynikami otrzymano pochodne FMDP z L- alaninamidami.

5.6.2. Aktywność koniugatów FMDP z glicynamidami i L-alaninamidami

Serię związków należących do analogów amidowych dipeptydów FMDP przebadano pod względem zdolności do hamowania wzrostu drobnoustrojów. Pomimo analogicznych podstawników, jak w przypadków pochodnych glikolamidowych oraz laktamidowych, połączenie amidowe z koniugatami znacznie obniżyło aktywność związków. Dla glicynamidów odnotowano słabą aktywność biologiczną w zakresie wysokich stężeń wobec szczepów z rodzaju *Candida*. Koniugaty alaninamidowe FMDP wykazały także słabą aktywność wobec szczepu *C. albicans*. Nie zaobserwowano aktywności wobec użytych w eksperymencie innych mikroorganizmów.

Związek	MIC ₈₀ [µg/ml]							
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i>	<i>C.</i> <i>parapsilosis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.</i> <i>epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>
41	1024	512	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>.1024
42	1024	512	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
43	>>1024	512	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
44	256	>1024	>1024	nb	nb	nb	nb	Nb
45	1024	>1024	>1024	nb	nb	nb	nb	Nb
46	128	>1024	>1024	nb	nb	nb	nb	Nb
Nva-FMDP	0,25	8	8	>1024	128	>1024	>1024	>1024

Tabela 8 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa koniugatów FMDP z amidami aminokwasów

W kolejnych eksperymentach sprawdzono, czy związki z grupy koniugatów glicynamidów i alaninamidów FMDP oraz analogiczne koniugaty estrowe są transportowane przez permeazy peptydowe. Wykonano testy aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków wobec szczepu *C. albicans* SC5314 oraz tego szczepu z usuniętym genem permeaz di- i tripeptydowych. Utrzymanie się zbliżonej wartości MIC w przypadku testu na obu szczepach *C. albicans* może wskazywać, że związki te nie są transportowane systemem permeaz peptydowych. Zjawisko to potwierdzają wyniki otrzymywane dla referencyjnego związku LysNvaFMDP, który jako peptydowy koniugat swą wysoką aktywność zawdzięcza szybkiemu transportowi przez permeazy. Szczepu *C. Albicans* OPTPTR SC5314 pozbawiony permeaz petydowych jest oporny na działanie peptydu LysNvaFMDP.

Związki	MIC ₈₀ [µg/ml]		Związki	MIC ₈₀ [µg/ml]	
	<i>C. albicans</i> SC5314	<i>C. albicans</i> OPTPTR SC5314		<i>C. albicans</i> SC5314	<i>C. albicans</i> OPTPTR SC5314
41	1024	>>1024	22	16	32
42	1024	>>1024	23	16	64
43	>>1024	>>1024	24	4	64
LysNvaFMDP	0,5	>>1024			

Tabela 9 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa glicynamidów i glikolamidów FMDP wobec mutantów delecyjnych *C. albicans*

Dla koniugatów glicynamidowych obserwuje się całkowite zahamowanie aktywności wobec szczepu *C. albicans* OPTPTR. Brak permeaz peptydowych uniemożliwia transport testowanych koniugatów peptydowych do komórek tego szczepu. W związkach zawierających analogiczne koniugaty estrowe 22-23 obserwuje się tylko nieznaczne obniżenie aktywności.

Związki	MIC ₈₀ [µg/ml]		Związki	MIC ₈₀ [µg/ml]	
	<i>C. albicans</i> SC5314	<i>C. albicans</i> SC5314		<i>C. albicans</i> SC5314	MIC ₈₀ [µg/ml]
34	512	>>1024	44	32	>>1024
35	32	64	45	1024	>>1024
36	64	128	46	256	>>1024
LysNvaFMDP	0,5	>>1024			

Tabela 10 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa koniugatów FMDP z L-laktamidami i glicynamidami

Analogiczne wyniki obserwuje się w przypadku pochodnych L-alaninamidowych. Związki te hamują wzrost mikroorganizmów silniej niż koniugaty z amidami glicyny, przy czym spadek zahamowania aktywności wobec szczepu OPTPTR *C.albicans* w przypadku tych pochodnych jest bardziej wyraźny. Dodatkowo, jak można zaobserwować, pochodne estrowe wobec tego mutantu są słabo aktywne, ale całkowity brak aktywności widać tylko wobec pierwszorzędowego L-laktamidu FMDP.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przedmiotem rozprawy doktorskiej są modyfikacje chemiczne analogów glutaminy – kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroil)-S-2,3-diaminopropanowego (FMDP) oraz kwasu N^3 -[(E)-4-fenilo-4-okso-2-butenoil]-S-2,3-diaminoaminopropanowego (BADP). Związki te są inhibitorami syntazy glukozamini-6-fosforanu, enzymu zaproponowanego jako jeden z celów molekularnych w terapii grzybic układowych. Pomimo silnych właściwości inhibicyjnych tych związków, nie obserwuje się zdolności do hamowania wzrostu drobnoustrojów. Brak aktywności przeciwdrobnoustrojowej inhibitorów spowodowany jest ich słabym transportem do wnętrza komórki. Poprawę biodostępności można osiągnąć m. in. przez modyfikacje chemiczne grupy karboksylowej inhibitora. Szereg wykonanych wcześniej badań wskazał, iż pochodne amidowe jak i estrowe dają szansę poprawy właściwości biologicznych, przy równoczesnym zachowaniu zdolności inhibicyjnych.

Założenia niniejszej pracy obejmowały syntezy prostych amidowych pochodnych FMDP i BADP. Zaplanowano otrzymanie pochodnych estrowych, zawierających funkcje karbonylową, a w dalszym etapie syntezę koniugatów FMDP i BADP z glicynamidami. Zakres badań rozszerzono o pochodne FMDP połączone z L-laktamidami oraz z amidowymi pochodnymi aminokwasów glicyny i L-alaniny. Wykonano badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych pochodnych oraz inhibicję enzymu syntazy glukozamino-6-fosforanu. Zbadano mechanizm transportu najbardziej aktywnych związków do komórki grzybowej. Metodą modelowania molekularnego zbadano dopasowanie najsilniejszych inhibitorów do centrum aktywnego enzymu.

W serii związków należących do grupy amidowych pochodnych FMDP i BADP otrzymano amid pierwszorzędowy oraz N-metylo i N,N-dimetyloamid. Aktywność wobec szczepu *C.albicans* wykazały tylko pochodne FMDP, a ich aktywność spadała wraz ze wzrostem ilości grup metylowych. Aktywność tych związków zależy w znacznym stopniu od inhibicji enzymu, co poza wynikami IC_{50} potwierdziły wyniki modelowania molekularnego. Pierwszorzędowy amid FMDP najlepiej odtwarza wiązania wodorowe substratu w centrum aktywnym enzymu. Badania transportu wykonane dla tej pochodnej nie wskazały na transport aktywny związku.

Wśród ketoestrowych pochodnych FMDP i BADP zanotowano obiecujące wyniki MIC głównie dla analogów FMDP. Najlepsze wyniki uzyskano w teście *in vitro* dla szczepów

grzybów z rodzaju *Candida* w szczególności *C. albicans*. Związki w zakresie wysokich stężeń hamowały także wzrost *C. glabrata* i *C. parapsilosis*. Wśród ketoestrów BADP tylko jedna z pochodnych wykazała aktywność, również przy bardzo wysokich parametrach MIC. Pochodne z tej grupy przebadano jako potencjalne inhibitory syntazy glukozamino-6-fosforanu. Wyniki potwierdziły korelację aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków *in vitro* ze zdolnością inhibicyjną, wyjątek stanowiła pochodna 17, dla której aktywności biologicznej nie obserwowano inhibicji enzymu. Dla ketoestrowych pochodnych FMDP wykonano dodatkowo modelowanie molekularne. Zdolność tych związków do oddziaływania z aminokwasami znajdującymi się w centrum aktywnym enzymu potwierdziła inhibicyjne właściwości estrów FMDP.

Grupa pochodnych w formie koniugatów z hydroksyamidami wykazała aktywność przeciwdrobnoustrojową wyłącznie wśród analogów FMDP. Grupa glikolamidowych pochodnych wykazywała najbardziej obiecujące wartości MIC. Nie zaobserwowano wpływu ilości podstawników na amidowym atomie azotu na aktywność tych związków. Natomiast parametr IC_{50} wskazał pochodne N-metylowe, jako najsilniejsze inhibitory w tej grupie. W przypadku L-laktamidowych pochodnych aktywność koniugatów maleje z ilością grup metylowych.

W toku badań otrzymano grupę glicynamidów i L-alaninamidów FMDP. Pochodne te w badaniach aktywności *in vitro* wskazywały na słaby potencjał przeciwdrobnoustrojowy. Związki te charakteryzowały się bardzo wysokimi wartościami MIC. Porównanie wyników aktywności tych związków z ich estrowymi analogami wskazuje, iż połączenia estrowe charakteryzują się lepszą aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Za pozytywnym aspektem połączeń estrowych przemawia również obiecujący wynik testów *in vitro* wobec szczepów *C. albicans* OPTPTR (mutantami delecyjnymi nie posiadające genów premeaz peptydowych). W teście wobec mutantów delecyjnych pochodne amidoestrowe wciąż wykazują aktywność hamującą wzrost. Wynik eksperymentu potwierdził natomiast dla koniugatów FMDP z amidami aminokwasów mechanizm transportu przez premeazy. Wyniki pozwalają przypuszczać, iż estrowe połączenia mogą być efektywnym systemem transportu. Uniknięcie mechanizmu transportu aktywnego nowych pochodnych, zapobiega indukcji oporności mikroorganizmów na stosowany chemoterapeutyk.

Podsumowując, w zakresie pracy doktorskiej zrealizowano syntezę nowych estrowych i amidowych pochodnych FMDP i BADP. W skład pochodnych BADP wchodziły analogi amidowe oraz keto-estrowe, a także połączenia z glikolamidami. Dla FMDP otrzymano pochodne amidowe, ketoestrowe, koniugaty glikolamidowe, L-laktamidowe oraz glicynamidowe i L-alaninamidowe. Struktury związków potwierdzono wynikami badań strukturalnych. Pochodne zbadano w testach inhibicji syntazy glukozy-6-fosforanu oraz w testach in vitro wobec szczepów grzybów z rodzaju *Candida*, a także wobec wybranych bakterii. Otrzymane wyniki potwierdziły kierunek modyfikacji grupy karboksylowej inhibitorów jako korzystny pod względem aktywności biologicznej jak i inhibicyjnej.

7. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

7.1. Informacje ogólne

Postęp reakcji chemicznych monitorowano wykorzystując metodę chromatografii cienkowarstwowej (TLC) przy użyciu płytek aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym DC-Alufolien Kieselgel 60 firmy Merck oraz DC- Alufolien Kieselgel 60 F254.

Stosowano następujące układy rozwijające:

- 1) octan etylu : metanol : woda (5 : 1 : 0,75)
- 2) butanol : kwas octowy : woda (4 : 1 : 1)
- 3) octan etylu : heksan (1 : 1)
- 4) heksan:octan etylu (4:1)
- 5) octan etylu
- 6) eter dietylowy
- 7) chloroform:metanol:kwas octowy (40:1:1)

Składy faz ruchomych zostały podane w stosunkach objętościowych.

Do wizualizacji związków zastosowane odczynniki wywołujące:

-wywoływacz siarczanowy: 20% roztwór siarczanu amonu w wodzie, 4ml kwasu siarkowego na 100ml roztworu

- wywoływacz ninhydrynowy: 400 mg ninhydryny, 200 ml alkoholu metylowego, 40 ml kwasu octowego, 2 ml kolidyny

-wywoływacz wanilinowy: 1g waniliny na 100ml 97% kwasu siarkowego

W chromatografii kolumnowej zastosowano jako fazę stacjonarną żel krzemionkowy Silica Gel 60 (0,063-0,200mm) firmy Merck.

Widma ^1H NMR wykonane zostały na aparacie Gemini Varian 200 MHz oraz Varian Unity Plus 500MHz. Widma masowe zarejestrowano za pomocą spektrometru Agilent Technologies 6540 UDH Accurate-Mass Q-TOF w zespole Prof. dr hab. inż. Agaty Kot-Wasik.

Temperatury topnienia nie były korygowane.

Badania inhibicji syntazy glukozamino-6-fosforanu wykonane zostały przez dr. inż. Karolinę Kwiatkowską i dr. inż. Iwonę Gabriel. Enzym grzybowy z *C. albicans*,

wyprodukowanego w komórkach *E. coli* i oczyszczono według opisanej wcześniej procedury.¹⁰¹,

Modelowanie molekularne uwzględniające dokowanie związku w centrum aktywnym syntazy glukozamino-6-fosforanu zostało wykonane przez dr. inż. Marka Wojciechowskiego. *In silico* projektowane związki przygotowano w programie Accelrys Discovery Studio,¹⁰² a ich geometrię optymalizowano w CHARMM. Struktura enzymu wykorzystana do obliczeń została oparta na 1GMS (PDB), obliczenia wykonano w programie Autodock.¹⁰³

Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz transportu związków zostały wykonane dzięki wsparciu dr. inż. Marty Schielmann. Aktywność związków zdefiniowano jako MIC₈₀ (minimalne stężenie związku hamujące wzrost hodowli mikroorganizmów w 80% w stosunku do kontroli). Pomiary absorbancji wykonane zostały przy użyciu czytnika mikroplątek Victor³, Perkin Elmer.

7.2. Otrzymywanie kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroilo)-*S*-2,3-diaminopropanowego (BocFMDP).

7.2.1. Synteza *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-(*S*)-asparaginy (Boc-L-Asn) 1a

50 g (0,33 mola) L-Asn H₂O i 27,7 g (0,33 mola) NaHCO₃ rozpuszczono w 350 ml wody, a następnie do roztworu wkroplono 80 g (0,37 mola) pirowęglanu *tert*-butylu rozpuszczonego w metanolu i mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego. Reakcję prowadzono przez 32 h w temperaturze pokojowej, po czym odparowano rozpuszczalnik, a pozostałość kolby rozpuszczono w 200 ml wody i zakwaszono do pH=3 przy użyciu NaHSO₄. Wytrącony osad ochłodzono, odsączono i przemyto zimną wodą do obojętnego odczynu, a następnie niewielką ilością eteru dietylowego. Otrzymano 54,5g Boc-L-Asn, t.t. 173-174⁰C, (lit.t.t. 174-176⁰C).

7.2.2. Synteza kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbononylo-(*S*)-2,3-diaminopropanowego (BocA₂pr) 1b

W kolbie wyposażonej w mieszadło magnetyczne rozpuszczono 15 g (64,5 mmola) *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-L-asparaginy i 22 g (68,3 mmola) PIDA w 72 ml octanu etylu, 72 ml acetonitrylu oraz 36 ml wody. Reakcję prowadzono przez 30 min w temperaturze 16⁰C, a następnie ogrzewano do temperatury pokojowej i kontynuowano reakcję przez 4

godziny. Wytrącony biały osad schłodzony do temperatury 0°C i odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym przemyto zimnym octanem etylu. Związek suszono na lejku pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 7,76 g (38 mmoli) BocA₂pr, wydajność reakcji 59%, t.t. 204-205°C (lit.t.t.¹⁰⁴ 203-206°C).

7.2.3. Synteza monoestru metylowego kwasu maleinowego 2a

Do 49 g (0,5 mola) bezwodnika maleinowego wkroplono 16 g (0,5 mola) metanolu, początkowo 10% objętości, a po ogrzaniu reagentów do 55°C i dodano pozostałą ilość odważonego alkoholu. Reakcję prowadzono przez 3 godziny w temperaturze 50-55°C, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej. Otrzymano 65 g (0,5 mola) produktu w formie oleju.

7.2.4. Synteza monoestru metylowego kwasu fumarowego 2b

65 g (0,5 mola) monoestru metylowego kwasu maleinowego rozpuszczono w 65 ml wody i dodano 3,1 (40,79 mmola) tiomocznika. Całość mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego przez 4 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie ochłodzono do temperatury 5°C. Wytrącony osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto trzema porcjami 50ml zimnej wody. Przesącz umieszczono w kolbie i dodano 2,6 g tiomocznika, a następnie mieszano przez 24 godziny, po czym ponownie schłodzono mieszaninę reakcyjną i odsączono produkt w formie białego osadu. Związek suszono na powietrzu, a następnie oczyszczano przez krystalizację z mieszaniny metanol: heksan. Otrzymano 25 g białych kryształów produktu, wydajność 39 %, t.t. 139-142°C.

7.2.5. Synteza estru *N*-hydroksysukcynoimidometylowego kwasu fumarowego 2c

7,8 g (60 mmoli) monoestru metylowego oraz 6,9 g (60 mmoli) *N*-hydroksysukcynoimidu rozpuszczono w 90 ml bezwodnego tetrahydrofuranu (THF). Roztwór schłodzono do temperatury 0-5°C po czym wkroplono do niego 13,6 g (66 mmoli) *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu rozpuszczonego w 200 ml THF. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Wytrącony produkt uboczny w formie osadu DCU odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, a w dalszej kolejności przemyto niewielką ilością THFu. Przesącz odparowano do gęstego oleju, a następnie związek krystalizowano z mieszaniny octanu etylu i heksanu. Otrzymano 5,99g (26,4 mmoli), wydajność 44%, t.t. 91-93°C (t.t. lit¹⁰⁵ 93-94°C)

7.2.6. Synteza kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*S*-2,3-diaminopropanowego 3a

Do kolby zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne, zawierającej 2,04 g (10 mmol) kwasu *N*³-*tert*-butoksykarbonylo-*S*-2,3-diaminopropanowego i 0,84 g (10 mmol) NaHCO₃ rozpuszczonych w 15 ml wody i 5ml THF, wkroplono roztwór 1,98 g (10 mmol) estru *N*-hydroksysukcynoimidowometylowego kwasu fumarowego w 30 ml THF. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w wodzie, po czym dwukrotnie ekstrahowano eterem dietylowym. Następnie warstwę wodną zakwaszono do pH=2 i ekstrahowano trzykrotnie octanem etylu. Wszystkie warstwy organiczne połączono, przemyto wodą destylowaną do obojętnego odczynu, po czym suszono bezwodnym MgSO₄. Po odsączeniu środka suszącego, odparowano rozpuszczalnik, aż do uzyskania suchego produktu. Ostatecznie otrzymano 2,69 g (89,77%) białego proszku kwasu *N*³-(4- metoksyfumaroiło)-*S*-2,3-diaminopropanowego. TLC w układzie 1: R_f = 0,26.

7.3. Otrzymywanie amidów kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*S*-2,3-diaminopropanowego (FMDP).

7.3.1. Otrzymywanie amidu kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*S*-2,3-diaminopropanowego (Boc-FMDP-NH₂) 6a

Do 1,2 g (3,4 mmol) kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*S*-2,3-diaminopropanowego rozpuszczonego w 15 ml THF i schłodzonego do ok. -10°C, dodano kolejno 0,37 ml (3,4 mmol) *N*-metylomorfoliny oraz 0,44 ml (3,4 mmol) chloromrówczanu izobutyli. Po 10 minutach dodano 0,94 ml (3,4mmola) 23,9% roztworu NH₃ w MeOH. Po 48 godzinach prowadzenia reakcji, odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w octanie etylu. Tak otrzymaną warstwę organiczną przemyto kolejno wodą destylowaną, 0,1M H₂CO₃, a następnie roztworem NaHSO₄.

Otrzymano 0,732 g Boc-FMDP-NH₂. t.t. 136-138°C, R_f 0.76 (ukł. 1), wydajność 61%.

¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3,8(s, 5H, OCH₃, NCH₂), 4,1(t, 1H, CH), 6,8(d, 3H, CH=CH, NH), 7,25(d, 2H, NH₂), 8,6(t, 1H, NH).

7.3.2. Otrzymywanie *N*-metyloamidu kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbononylo-*N*³-(4-metoksyfumaroylo)-*S*-2,3-diaminopropanowego (Boc-FMDP-NHCH₃) 7a

Z 0,95 g (3 mmole) kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbononylo-*N*³-(4-metoksyfumaroylo)-*S*-2,3-diaminopropanowego prowadzono reakcję według procedury dla związku 6a z dodatkiem 0,26 ml (3 mmole) *N*-metyloaminy. Otrzymano 0,880 g Boc-FMDP-NHCH₃. t.t. 115 °C, R_f 0. 0.59 (ukł. 1), wydajność 65,6%.

¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 1.4(s, 9H, C(CH₃)₃), 3,4(s, 3H, CH₃) 3,75(s, 5H, OCH₃, NCH₂), 4,1(t, 1H, CH), 6,8(d, 3H, CH=CH, NH), 7,85(t, 1H, H), 8,6(t, 1H, NH)

7.3.3. Otrzymywanie *N,N*-dimetyloamidu kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbononylo-*N*³-(4-metoksyfumaroylo)-*S*-2,3-diaminopropanowego Boc-FMDP-N(CH₃)₂ 7b

Z 0,45 g (1,4 mmola) kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbononylo-*N*³-(4-metoksyfumaroylo)-*S*-2,3-diaminopropanowego według procedury jak dla związku 6a w reakcji z rozpuszczonego w 0,17 ml (1,4 mmola) dimetyloaminy. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie octan etylu:metanol 5:1. Otrzymano 0,320 g produktu t.t. 96-98°C, R_f 0.74 (ukł. 1), wydajność 89%.

¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2,85 (s, 3H, CH₃), 3,1 (s, 3H, CH₃), 3,5 (s, 5H, OCH₃, NCH₂), 4,6 (t, 1H, CH), 6,8 (d, 3H, CH=CH, NH), 8,65 (t, 1H, NH)

7.3.4. Otrzymywanie chlorowodoru kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroylo)-*S*-2,3-diaminopropanowego FMDP-NH₂ 6

Do 1 mmola związku dodano 5 ml roztworu 4 M HCl w dioksanie. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 3 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a uzyskany produkt trzykrotnie przemyto eterem dietylowym i odsączono, po czym suszono w eksykatorze i przechowywano w obecności środka suszącego. W wyniku reakcji otrzymano białego proszku 0,551 g FMDP-NH₂ (6), t.t. 203-204°C, R_f 0.18 (ukł. 5:1:0,75), wydajność 84%,

¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ 3,7 (s, 5H, OCH₃, NCH₂), 4,15 (t, 1H, CH), 6,8(d, 2H, CH=CH), MS (m/z): 198,0868 [M-H₂O]⁺, 216,0977 [M+H]⁺, 238,0797 [M+Na]⁺.

7.3.5. Otrzymywanie chlorowodoru *N*-metyloamidu kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroylo)-*S*-2,3-diaminopropanowego FMDP-NHCH₃ 7

Reakcję prowadzono według procedury dla związku 6 w formie białego proszku 0,600 g FMDP-NHCH₃ (7) t.t. 190-194 °C, R_f 0.21 (ukł. 5:1:0,75), wydajność 87%,

^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ 2,7(s, 3H, CH_3) 3,7(s, 5H, OCH_3 , NCH_2), 4,1(t, 1H, CH), 6,8(d, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), MS (m/z): 212,1026 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 230,1132 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 252,0958 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

7.3.6. Otrzymywanie chlorowodoru kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego FMDPN(CH_3)₂ 8

Reakcję prowadzono według procedury dla związku 6, uzyskano produkt w formie białego proszku 0,215 g FMDP-N(CH_3)₂ (4b) t.t. 150 °C, Rf 0.19 (ukł. 5:1:0,75), wydajność 63%.

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2,85(s, 3H, CH_3), 3,1(s, 3H, CH_3), 3,5(d, 2H, NCH_2), 3,5(s, 3H, OCH_3) 4,5(t, 1H, CH), 6,7(d, 3H, $\text{CH}=\text{CH}$), 8,3(s, 2H, NH_2), 9,15(t, 1H, NH), MS (m/z): 226,1183 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 244,1291 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 266,1108 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

7.4. Otrzymywanie kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo-(S)- N^3 -[(E)-4-fenyl-4-oksobutenoylo]diaminopropanowego (BocBADP).

7.4.1. Synteza kwasu (E)-4-fenyl-4-okso-2-butenowego (β -benzoiloakrylowego kwasu) 2d

W kolbie 3-szyjnej 500ml z mieszadłem i chłodnicą zwrotną umieszczono 17,1g (0,174 mola) bezwodnika maleinowego w 100ml benzenu (1,12 mola), po rozpuszczeniu bezwodnika dodawano w ciągu 20 min, porcjami 50g (0,375 mola) bezwodnego chlorku glinu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze 90°C przez 1 godzinę. Po tym czasie mieszaninę oziębiono w łaźni lodowej, a do kolby wkroplono 100ml wody i 25 ml stężonego roztworu HCl. Następnie oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem benzen i część wody. Kolbę płukano gorącą wodą, a powstały brunatny osad rozpuszczono w eterze dietylowym, przemyto wodą i roztworem HCl. Otrzymany osad rozpuszczono w roztworze węgla sodu i sączono z dodatkiem ziemi fulerenej. Przesącz podgrzano z dodatkiem 2g węgla aktywnego, następnie ponownie sączono i ochłodzono delikatnie odbarwiony roztwór. Do roztworu dodano 35 ml roztworu HCl, kolbę oziębiono i otrzymano żółty osad. Osad sączono pod ciśnieniem i przemyto zimną wodą, suszono w temperaturze 50°C, a następnie rekrytalizowano z ok.70 ml benzenu. Otrzymano 22,21g (72%) kwasu (E)-4-fenyl-4-okso-2-butenowego. TLC (1) $R_f=0,54$, t.t.=92-94°C. t.t.lit.¹⁰⁶=95-96°C

7.4.2. Synteza estru *N*-hydroksysukcynimidowego kwasu (E)-4-fenylo-4-okso-2-butenowego 2 e

W świeżo przedestylowanym THF (40ml) rozpuszczono 3,54 g (20 mmoli) kwasu (E)-4-fenylo-4-okso-2-butenowego i 2,3 g (20 mmoli) *N*-hydroksysukcynoimidu. Kolbę oziębiono do temperatury 0°C i wkroplono roztwór 4,5 g (22 mmoli) w 20ml THF. Reakcję kontynuowano przez 20 godzin, a po tym czasie odsączono osad DCU, przesącz został zatężony do połowy objętości i pozostawiony w temperaturze 10°C przez kolejne 2 godziny. Ponownie odsączono osad DCU, a następnie odparowano nadmiar THF i krystalizowano przez dodanie eteru dietylowego i niewielkiej ilości heksanu. Otrzymano 2,73g (50%) żółtych kryształów estru aktywnego. TLC (6) $R_f=0,56$, t.t.=96-101°C.

7.4.3. Synteza kwasu *N*²-tert-butoksykarbonylo-(*S*)-*N*³-[(E)-4-fenylo-4-oksobutenoilo]-2,3-aminopropanowego 4

2,04g (0,01mola) kwasu *N*²-tert-butoksykarbonylo-(*S*)-2,3-diaminopropanowego i 0,84g (0,01mola) NaHCO₃ rozpuszczono w 20 ml wody i 5 ml THF, roztwór oziębiono do temperatury 0-5°C i powoli wkroplono roztwór 2,7g (0,01mola) estru *N*-hydroksysukcynimidowego kwasu (E)-4-fenylo-4-okso-2-butenowego w 20 ml THF. Reakcję mieszano i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godziny. Po tym czasie odparowano THF, pozostałość została rozpuszczona w wodzie i zakwaszona za pomocą NaHSO₄ do pH ok. 2. Następnie warstwę wodną ekstarhowano 3 porcjami octanu etylu (po ok. 50 ml). Warstwy organiczne połączono, przemyto wodą i suszono przez dodanie bezwodnego MgSO₄. Po odparowaniu rozpuszczalnika analiza TLC (1) wykazała zanieczyszczenie produktu, zatem konieczne było oczyszczanie związku za pomocą chromatografii kolumnowej. Przeprowadzono ją na żelu krzemionkowym w układzie octan etylu:metanol 1:1. Oczyszczonego kwasu *N*²-tert-butoksykarbonylo-(*S*)-*N*³-[(E)-4-fenylo-4-oksobutenoilo]aminopropanowego otrzymano 2,33g (63%). TLC (1) $R_f=0,39$.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1,44 (s, 9H, 3x(CH₃)); 2,77 (s, 3H, NH); 3,84 (t, 2H, CH₂NH) 4,43 (m, 1H, CH) 6,03 (d, 1H, CONH); 7,06 (d, 1H, HC=); 7,4 (m, 5H, Ph), 7,61 (d, 1H, HC=); 8,02 (t, 1H, CONH).

7.5. Otrzymywanie kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo-(S)- N^3 -[(2E)-3-(2-fenyl-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego]aminopropanowego.

7.5.1. Synteza ketalu kwasu (E)-4-fenyl-4-okso-2-butenowego 2f

Do roztworu 0,354g (2 mmole) kwasu (E)-4-fenyl-4-okso-2-butenowego w 15ml benzenu dodano 1,6ml (9,69 mmola) ortomrówczanu trietylu, 1,1ml (19,38 mmola) glikolu etylenowego oraz katalityczna ilość kwasu p-toluenosulfonowego (0,05g , 0,3 mmola). Kolbę zabezpieczono przed dostępem wilgoci ogrzewano w temperaturze 35⁰C przez 30 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną rozpuszczono w octanie etylu ok. 20ml i przemyto roztworem solanki. Warstwę wodną ekstrahowano 3 porcjami octanu etylu (po 50 ml). Warstwy organiczne połączone i suszono przy użyciu bezwodnego MgSO₄. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano mieszaninę kwasu (2E)-3-(2-fenyl-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego i jego estru etylowego, który hydrolizowano w mieszaninie 10ml 2M KOH i 40 ml metanolu w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie roztwór zakwaszono HCl do pH 4, a następnie ekstrahowano chlorkiem metylenu. Warstwa organiczna została osuszona nad MgSO₄, a po odparowaniu rozpuszczalnika produkt oczyszczono na kolumnie z żelazem krzemionkowym w układzie chloroform: kwas octowy 60:1. Otrzymano 0,267g (61%) białego kryształów kwasu (2E)-3-(2-fenyl-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego. TLC (4) R_f = 0,44, t.t=98-102⁰C.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 4,2 (m, 4H, CH₂CH₂), 6,3 (d, 1H, HC=,); 7,2 (d, 1H, HC=,); 7,53 (m, 3H, Ph), 7,68 (m, 3H, Ph)

7.5.2. Synteza estru *N*-hydroksysukcynimidowego kwasu (2E)-3-(2-fenyl-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego 2g

0,267g (1,2 mmola) kwasu (2E)-3-(2-fenyl-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego i 0,138g (1,2 mmola) *N*-hydroksysukcynoimidu rozpuszczono w 10 ml suchego THF, następnie roztwór schłodzono w łaźni lodowej do temperatury 0-5⁰C. Do mieszaniny wkropiono roztwór 0,269g (1,2 mmola) DCC w 7 ml THF, a następnie reakcję prowadzono przez 24 godziny. Po tym czasie wytrącony osad DCU odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie odparowano część rozpuszczalnika i pozostawiono do wytrącenia się kolejnej porcji osadu DCU. Po tym czasie odfiltrowano pozostałość osadu DCU, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do postaci oleju. Produkt rozpuszczono w octanie etylu, a następnie krystalizowano eterem dietylowym z dodatkiem

heksanu. Otrzymano 0,201g (53%) białych kryształów estru *N*-hydroksysukcynimidowego kwasu (2*E*)-3-(2-fenylo-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego. TLC (1) $R_f=0,9$, t.t. = 125-128°C

7.5.3. Synteza kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-(*S*)-*N*³-[(2*E*)-3-(2-fenylo-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego]diaminopropanowego 5

Do 0,065 g (0,32 mmola) kwasu *N*³-*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowego i 0,027g (0,32 mmola) NaHCO₃ rozpuszczonych w 5 ml wody i 2 ml THF, wkroplono 0,1 g (0,32 mmol) estru *N*-hydroksysukcynimidowego kwasu (2*E*)-3-(2-fenylo-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego w 5 ml THF. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny w kolbie z mieszadłem magnetycznym. Po tym czasie odparowano THF, a pozostałość rozpuszczono w wodzie, następnie doprowadzono do pH=2 za pomocą roztworu NaHSO₄ i ekstrahowano octanem etylu. Warstwy octanowe połączono, suszono bezwodnym MgSO₄, a następnie po odsączeniu środka suszącego odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem.

Analiza TLC otrzymanego produktu na tym etapie wykazała zanieczyszczenia, zatem przeprowadzono oczyszczanie za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie octan etylu : metanol 2:1 (v/v). Otrzymano 0,088g (55%) białego osadu kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-(*S*)-*N*³-[(2*E*)-3-(2-fenylo-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego]aminopropanowego TLC (1) $R_f=0,51$.

7.6. Otrzymywanie amidów BADP

7.6.1. Otrzymywanie amidu kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-(*S*)-*N*³-[(2*E*)-3-(2-fenylo-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego]-2,3-diaminopropanowego 9a

Do 0,084 g (0,2 mmola) kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-(*S*)-*N*³-[(2*E*)-3-(2-fenylo-1,3-dioksolan-2-yl)-2-propenowego]aminopropanowego rozpuszczonego w 5 ml THF i schłodzonego do temperatury ok. -10°C, dodano kolejno 0,024 ml (0,2 mmola) *N*-metylomorfoliny oraz 0,026 ml (0,2 mmola) chloro mrówczanu izobutyli. Po 10 minutach dodano 0,02 ml (0,2 mmol) 23,9% roztworu NH₃ w MeOH. Po 18 godzinach prowadzenia reakcji, odparowano rozpuszczalnik, a pozostały osad płukano eterem dietylowym i odsączono. Otrzymano biały osad w ilości 0,072 g (89%), TLC(1) $R_f=0,76$.

^1H NMR (200 MHz, DMSO): δ 1,37 (s, 9H, 3x(CH₃)), 3,3 (s, 3H, CHCO); 3,62 (t, 2H, CHCH₂NH), 3,92 (t, 2H, CH₂), 4,05 (t, 2H, CH₂), 6,17 (d, 1H, HC=,); 6,6 (d, 1H, HC=,); 6,7 (d, NHCH), 7,1 (t, 1H, CONH), 7,4 (m, 5H, Ph), 7,7 (s, 1H,CONH), 8,3 (s, 1H,CONH),.

7.6.2. Otrzymywanie N-metyloamidu kwasu *N*²-tert-butoksykarbonylo-(*S*)-*N*³-[(*E*)-4-fenilo-4-oksobutenoilo]-2,3-aminopropanowego Boc-BADP-NHCH₃
10a

0,362g BocBADP (0,001mola) rozpuszczono w 4ml destylowanego THF, po czym dodano 0,11ml N-metylomorfoliny i ochłodzono mieszaninę reakcyjną do temperatury – 5°C. Do kolbki wkroplono 0,13 ml chloromrówczanu sec-butyłu, a po czasie 10 minut dodano 0,0863ml 40% wodnego roztworu metyloaminy. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej z mieszaniem i obserwowano wytrącający się osad. Po 20h odparowano THF, a pozostałość rozpuszczono w 100ml octanu etylu, aby rozpuścić w całości trudno rozpuszczalny osad. Warstwę organiczną płukano 1M NaHSO₄, NaHCO₃, wodą do pH=7. Następnie warstwę organiczną suszono przy użyciu bezwodnego MgSO₄. Środek suszący został odsączony, a w trakcie odparowywania rozpuszczalnika osad szybko wypadał. Krystalizowano z niewielkiej ilości octanu etylu i eteru, otrzymując 0,135g związku.

^1H NMR (200 MHz, DMSO): δ 1,4 (s, 9H, 3x(CH₃)), 3,3 (s, 3H, CH₃NH); 3,72 (t, 2H, CHCH₂NH), 3,9 (t, 2H, CH₂), 4,6 (t, 2H, CH₂), 5,7 (d, 1H, HC=,); 6,5 (d, 1H, HC=,); 6,7 (d, NHCH), 7,4 (m, 5H, Ph), 7,7 (s, 1H,CONH), 8,3 (s, 1H,CONH),

7.6.3. Otrzymywanie N,N-dimetyloamidu kwasu *N*²-tert-butoksykarbonylo-(*S*)-*N*³-[(*E*)-4-fenilo-4-oksobutenoilo]- 2,3- aminopropanowego Boc-BADP-N(CH₃)₂ 11a

0,362g BocBADP (0,001mola) rozpuszczono w 5ml THFu, schłodzono do temperatury –5°C po czym dodano 0,1ml N-metylomorfoliny i 0,13 ml chloromrówczanu sec-butyłu. Po czasie ok. 10 min wkroplono 0,13ml 40% wodnego roztworu dimetyloaminy. Następnie prowadzono reakcję przez 24h w temperaturze pokojowej z mieszaniem. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki, biały osad rozpuszczono w octanie etylu i płukano wodą, 1M NaHSO₄, 5% NaHCO₃, a następnie warstwę organiczną suszono na bezwodnym MgSO₄. Po odsączeniu środka suszącego

odparowano nadmiar octanu etylu i krystalizowano produkt, kryształy odsączono i płukano eterem dietylowym. Otrzymano 256mg białych kryształów z wydajnością 66%. Analiza TLC(ukł.1) $R_f=0,76$

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO): δ 1,45 (s, 9H, $3\times(\text{CH}_3)$), 2,7 (s, 3H, CH_3N); 3,1 (s, 3H, CH_3N); 3,72 (t, 2H, CHCH_2NH), 3,9 (t, 2H, CH_2), 4,6 (t, 2H, CH_2), 6,2 (d, 1H, $\text{HC}=\text{,}$); 6,8 (d, 1H, $\text{HC}=\text{,}$); 6,7 (d, NHCH), 7,4 (m, 5H, Ph), 7,7 (s, 1H, CONH).

7.6.4. Otrzymywanie chlorowodoru amidu kwasu N^3 -[(E)-4-fenilo-4-oksobutenoilo]- (S)-2,3- aminopropanowego BADP- NH_2 9

0,072 g (0,177mmol) amidu kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-(S)- N^3 -[(2E)-3-(2-fenilo-1,3- dioksolan-2-ylo)-2-propenowego]aminopropanowego rozpuszczono w 3ml 4M roztworu HCl/dioksan i pozostawiono na 2,5 godziny w szczelnie zamkniętej kolbce w temperaturze pokojowej. Po tym czasie zawartość kolbki odparowano do sucha, a otrzymany osad płukano 2-krotnie eterem dietylowym i odparowywano do sucha. Osad rozdrobniono i odsączono, kilkakrotnie przepłukano eterem dietylowym, a następnie odparowano rozpuszczalniki do sucha otrzymując 25mg produktu. (49%)

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, D_2O): δ 3,129 (s, 3H, CH_3), 3,8 (d, 2H, CH_2), 4,7(t, 1H, CH), 5,91(d, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 6,4 (d, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 7,7 (m, 5H, Ph)

7.6.5. Otrzymywanie chlorowodoru N-metyloamidu kwasu N^3 -[(E)-4-fenilo-4-oksobutenoilo]- (S)-2,3- aminopropanowego BADP- NHCH_3 10

100mg (0,276mmola) N-metyloamidu Boc-BADP rozpuszczono w 3ml 4M roztworu HCl/dioksan i pozostawiono na 2,5 godziny. Postępując zgodnie z procedurą dla związku 9 otrzymano 70 mg produktu.(84%)

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, D_2O): δ 2,73(s, 3H, CH_3); 3,76 (m, 2H, CH_2CH), 4,05(t, 1H, CH), 6,91(d, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 7,8 (d, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 7,6 (m, 5H, Ph)

7.6.6. Otrzymywanie chlorowodoru N,N-dimetyloamidu kwasu N^3 -[(E)-4-fenilo-4-oksobutenoilo]- (S)-2,3- aminopropanowego BADP- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 11

200mg (0,552mmola) N,N-dimetyloamidu Boc-BADP rozpuszczono w 5ml 4M roztworu HCl/dioksan i pozostawiono na 3 godziny. Postępując zgodnie z procedurą dla związku 9 otrzymano 163 mg produktu.(97%)

^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ 2,905(s, 3H, CH_3), 3,129 (s, 3H, CH_3), 3,76 (m, 2H, CH_2), 4,7(t, 1H, CH), 6,91(d, 1H, CH=), 7,8 (d, 1H, CH=), 7,7 (m, 5H, Ph)

7.7. Otrzymywanie amidowych i N-metyloamidowych pochodnych kwasu glikolowego i mlekowego

7.7.1. Synteza estru metylowego kwasu glikolowego 18

W kolbie z mieszadłem magnetycznym umieszczono 5g kwasu glikolowego (0,068mola) rozpuszczonego w 70ml metanolu (1,73 mola), następnie do mieszaniny reakcyjnej zostało dodane 12,38g (0,2mola) kwasu borowego, jako katalizatora reakcji. Mieszanie kontynuowano przez 20 godzin, następnie odparowano nadmiar metanolu oraz powstały w reakcji $\text{B}(\text{OMe})_3$. Wytrącony osad został odsączony, a z pozostałości wydestylowano w temp. 35°C w 10mmHg 3,882g bezbarwnej cieczy (wydajność 65,6%).

7.7.2. Synteza glikolamidu 19

Do 4,686 g (0,052 mola) estru metylowego kwasu glikolowego w 5 ml MeOH ochłodzonego do ok. 0°C wkroplono 4,74 ml roztworu 23,9 % NH_3/MeOH . Reakcję kontynuowano przez 6 godzin w temperaturze pokojowej, a po tym czasie zaobserwowano wytrącanie się białego krystalicznego osadu, a następnie mieszaninę zostawiono na noc w lodówce. W celu zwiększenia ilości wykrystalizowanego produktu dodano niewielką ilość eteru dietylowego. Otrzymano 2,245 g (57%) białych kryształów glikolamidu, analiza TLC(1) $R_f=0,36$, t.t.= $113-116^\circ\text{C}$ t.t._{lit.}= $118-120^\circ\text{C}$

7.7.3. Synteza N-metyloglikolamidu 20

W kolbie kulistej umieszczono 1,5 ml 40% wodnego roztworu N-metyloaminy w 2 ml THF, następnie mieszaninę ochłodzono do temp. Ok. 5°C i powoli wkroplono 1 ml estru metylowego kwasu glikolowego. Przez 1,5 godziny utrzymywano temperaturę $15-20^\circ\text{C}$ i mieszano w temperaturze pokojowej przez następne 24 godziny. Po tym czasie nadmiar rozpuszczalników odparowano uzyskując gęsty olej, w celu pozbycia się pozostałości wody, kilkakrotnie dodawano porcje acetonitrylu i odparowywano. Następnie do otrzymanego oleju dodano eter dietylowy na ciepło i krystalizowano. Odsączone kryształy płukano eterem dietylowym oraz kilkoma mililitrami heksanu. Uzyskano 0,213g związku (18%) o t.t. $54-56$, t.t._{lit.}= $64-65$. Analiza TLC $R_f=0,38$ (ukł. 1)

7.7.4. Synteza *N,N*-dimetyloglikolamidu 21

W kolbce z mieszanym umieszczono 1,2 g (0,013mola) estru metylowego kwasu glikolowego, a następnie wkroplono 3ml 40% wodnego roztworu dimetyloaminy. Reakcję prowadzono z mieszanym przez 24 godziny. Nadmiar rozpuszczalników odparowano, a pozostałość oczyszczono za pomocą kolumny chromatograficznej z żelom krzemionkowym, jako eluent octan etylu. Po odparowaniu rozpuszczalników otrzymano krystaliczny związek o masie 0,286 g. Wyd. 21%

Analiza TLC $R_f=0,469$ (ukł. 1) wywoływacz jod T.t 43-45, t.t lit=40-42°C

7.7.5. Synteza amidu kwasu L-mlekowego 28

W 2 ml metanolu rozpuszczono 4ml (0,012mol) L-mleczanu etylu. Po schłodzeniu do temperatury ok. 5°C dodano 1,1ml (0,013mola) 23.9% roztworu amoniaku w metanolu. Po 24h prowadzenia reakcji w temperaturze pokojowej rozpuszczalnik i substraty odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymano 1,181g (82%) 28 w postaci gęstego oleju.

7.7.6. Synteza *N*-metyloamidu kwasu L-mlekowego 29

Otrzymano według procedury dla związku 28 z wykorzystaniem 40% wodnego *N*-metyloaminy. Otrzymano 1,23g (75%) związku 29 w postaci bezbarwnego oleju.

7.7.7. Synteza *N,N*-dimetyloamidu kwasu L-mlekowego 30

Otrzymano 1,13g oleju według procedury dla związku 28 przy użyciu 40% wodnego roztworu *N,N*-dimetyloaminy. Olej (64%) rozpuszczono w kilku mililitrach octanu etylu, a następnie krystalizowano przez dodatek eteru naftowego, otrzymano 250mg białych kryształów związku 30.

7.8. Otrzymywanie amidowych i *N*-metyloamidowych pochodnych glicyny i *L*-alaniny.

7.8.1. Synteza Boc-glicynamidu 34a

1 g Boc-Gly rozpuszczono w 7ml THF mieszałem mieszadłem magnetycznym i schłodzono do temperatury -10°C, następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 0,63ml *N*-metylomorfoliny oraz 0,75 chloromrówczanu izobutylu. Po czasie 10 min do kolby wkroplono 0,7 ml roztworu 23,9% amoniaku w metanolu. Po 24h mieszaninę reakcyjną odparowano do sucha, rozpuszczono w octanie etylu, a następnie płukano kolejno wodą,

NaHSO₄, wodą, NaHCO₃, oraz wodą do pH=7, suszono nad MgSO₄. Po odsączeniu środka suszącego, produkt zateżono i krystalizowano z dodatkiem eteru naftowego. Otrzymano 670 mg (wyd. 67%) białych kryształów związku o t.t 79-81⁰C, R_f=0,66 (ukł. 1)

7.8.2. Synteza chlorowodorku glicynamidu 34

Zgodnie z procedura otrzymywania związku 6 otrzymano 188mg,(79%) t.t 194-198⁰C, t.t._{lit}=204 ⁰C, R_f=0,14 (ukł. 2)

7.8.3. Synteza N-metylo Boc-glicynamidu 35a

Syntezę wykonano zgodnie z procedurą opisaną dla związku 34a przy użyciu 40% roztworu N-metyloaminy w metanolu. Uzyskano 869 mg (wyd. 80%) białych kryształów produktu o t.t. 75-77⁰C, R_f=0,67 (ukł. 1).

7.8.4. Synteza chlorowodorku N-metyloglicynamidu 35

Zgodnie z procedurą otrzymywania związku 6 zostało otrzymane 183 mg (85%) produktu w postaci białego proszku, t.t. 143-145⁰C, R_f=0,28 (ukł. 2)

7.8.5. Synteza N,N-dimetylometylo Boc-glicynamidu 36a

Synteza z wykorzystaniem 40% roztworu N,N-dimetyloaminy w metanolu została przeprowadzona według metody dla związku 34a . Otrzymano 540 mg (wyd.46%) białych kryształów związku, t.t 69-70⁰C, R_f=0,7 (ukł. 1).

7.8.6. Synteza chlorowodorku N,N-dimetyloglicynamidu 36

Z 500mg związku 36a potraktowanego 10ml HCl w dioksanie zgodnie z metodą wykorzystaną dla otrzymywania związku 6 otrzymano 250 mg (84%) produktu w postaci białego proszku, t.t. 116-120⁰C, R_f=0,19 (ukł. 2)

7.8.7. Synteza Boc-L-alaninamidu 37a

700 mg Boc-alaniny rozpuszczono w 7ml THF mieszano mieszadłem magnetycznym i schłodzono do temperatury -10⁰C, następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 0,41 ml N- metylomorfoliny oraz 0,48 ml chloromrówczanu izobutyli. Po czasie 10 min do kolby wkroplono 0,5 ml roztworu 23,9% amoniaku w metanolu. Po 18h mieszaninę reakcyjną odparowano do sucha, rozpuszczono w octanie etylu, a następnie płukano kolejno wodą, NaHSO₄, wodą, NaHCO₃, oraz wodą do pH=7, suszono nad MgSO₄. Po odsączeniu środka suszącego, produkt zateżono i krystalizowano z dodatkiem eteru naftowego. Otrzymano 0,581mg białych kryształów związku o t.t 79-81⁰C, R_f=0,66 (ukł. 1)

7.8.8. Synteza chlorowodorku L-alaninamidu 37

Zgodnie z procedurą otrzymywania związku uzyskano w formie sypkiego proszku 174m g produktu.

7.8.9. Synteza N-metyloamidu Boc-L-alaniny 38a

Z 700 mg Boc-alaniny według procedury otrzymywania związku 37a otrzymano 872mg związku o t.t, Rf=0,66 (ukł. 1)

7.8.10.Synteza chlorowodorku N-metyloamidu-L-alaniny 38

Z 300mg związku 38a zgodnie z metodą wykorzystaną dla otrzymywania związku 6 otrzymano 202 mg produktu w postaci białego proszku, Rf= 0, 68(ukł. 2)

7.8.11.Synteza N,N-dimetyloamidu Boc-L-alaniny 39a

Synteza prowadzono jak dla związku 34z wykorzystaniem 0,47ml 40% roztworu N,N- dimetyloaminy w metanolu. Otrzymano związek w formie oleju 600 mg Rf=0,7 (ukł. 1).

7.8.12.Synteza chlorowodorku N,N-dimetyloamidu-L-alaniny 39

Z 600mg oleju związku zgodnie z metodą wykorzystaną dla otrzymywania związku 6 zostało otrzymane 316 mg produktu w postaci białego proszku.

7.9.Otrzymywanie ketoestrowych pochodnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego FMDP.

7.9.1. Synteza estru acetylometylowego kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego. 12a

Do 1,2 g (4 mmol) kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego rozpuszczonego w 30 ml THF, dodano 0,56 ml (4 mmol) trietyloaminy, 0,34 ml (4 mmol) chlorku acetonu oraz 0,132 g (0,8 mmol) jodku potasu. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Po odparowaniu pod zmniejszonym ciśnieniem rozpuszczalnika, otrzymano olej, który następnie rozpuszczono w octanie etylu. Tak otrzymaną warstwę organiczną przemyto kolejno wodą destylowaną a następnie 5% NaHCO₃. Po osuszeniu warstwy octanowej bezwodnym MgSO₄, kolejno odsączono środek suszący, po czym odparowano rozpuszczalnik. Jako układu rozdzielającego użyto układ 5. Po zebraniu odpowiednich frakcji, odparowano do sucha rozpuszczalnik. Produkt krystalizowano przez dodatek 10 ml eteru dietylowego. Otrzymano

0,882 g (2,4 mmol) estru acetylometylowego kwasu N^2 -tert-butoksykarbonilo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- S -2,3-diaminopropanowego z wydajnością 65%. TLC w układzie 1: Rf = 0,8, t. t. 86-88°C.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1,43 (s, 9H, $3\times(\text{CH}_3)$); 2,22 (s, 3H, COCH_3); 3,8 (s, 3H, COOCH_3); 5,7 (d, 1H, CONH);

7.9.2. Synteza estru 1-metylo-2-oksopropylowego kwasu N^2 -tert-butoksykarbonilo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- S -2,3-diaminopropanowego 13a

Do 0,6g (2mmole) kwasu N^2 -tert-butoksykarbonilo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- S -2,3-diaminopropanowego rozpuszczonego w 15 ml THF dodano 0,28ml (2mmole) trietyloaminy, a następnie 0,22g (2mmole) 3-chloro-2-butanonu. Do mieszaniny reakcyjnej dodany został także jodek potasu w katalitycznej ilości (0,05g). Reakcję prowadzono przez 72 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, aż do otrzymania gęstego oleju, który następnie został rozpuszczony w octanie etylu. Warstwę organiczną przemyto kolejno wodą destylowaną, 5% roztworem NaHCO_3 , a następnie suszono bezwodnym MgSO_4 . Po odsączeniu środka suszącego, odparowano rozpuszczalnik do sucha, a pozostałość oczyszczono z zastosowaniem chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym z układu chloroform:aceton 4,5:1. Produkt otrzymano w ilości 0,716g (81%)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1,4 (s, 9H, $3\times(\text{CH}_3)$); 1,5 (s, COCH_3), 3,79 (s, 3H, COOCH_3); 4,14 (t, 2H, CHCH_2NH), 4,5 (m, 1H, CH), 4,85 (d, 1H, CHCO), 5,25 (d, 1H, CHCO), 5,7 (d, 1H, CONH); 6,81 (d, 2H, HC=); 6,92 (d, 1H, HC=); 7,4 (t, 1H, CONH).

7.9.3. Synteza 3,3-dimetylo-2-okso-butyłowego kwasu N^2 -tert-butoksykarbonilo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- S -2,3-diaminopropanowego 14a

0,3 g (1 mmol) kwasu N^2 -tert-butoksykarbonilo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- S -2,3-diaminopropanowego rozpuszczono w 15ml MeOH i 2 ml wody, następnie miareczkowano 20% roztworem wodnym CsCO_3 , aż do otrzymania roztworu o pH = 7. Tak otrzymaną sól cesową odparowano do sucha, po czym rozpuszczono ją w 7 ml DMF. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 0,135ml (1mmol) 1-chloropinakolonu, a reakcję prowadzono przez 48 godzin. Po tym czasie odparowano część DMFu, pozostałość rozpuszczono w wodzie i ekstrahowano 3 porcjami octanu etylu. Warstwy organiczne zostały połączone, suszone nad MgSO_4 , a po odsączeniu środka suszącego odparowano rozpuszczalnik do oleju.

Pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie chlorek metylenu : aceton 4:1 (v/v). Oczyszczony produkt krystalizowano z mieszaniny octanu etylu i heksanu, otrzymano 0,241g (61%) białych kryształów Boc-FMDP-pinakolonu, analiza TLC (1) $R_f=0,85$, t.t =94-96°C.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 1,23 (s, 9H, 3x(CH₃)); 1,43(s, 9H, 3x(CH₃)), 3,79 (s, 3H, COOCH₃); 4,14 (t, 2H, CHCH₂NH), 4,5 (m, 1H, CH), 4,85 (d, 1H, CHCO), 5,3 (d, 1H, CHCO), 5,7 (d, 1H, CONH); 6,81 (d, 1H, HC=, J = 81Hz); 6,92 (d, 1H, HC=, J = 81Hz); 7,63 (t, 1H, CONH).

7.9.4. Synteza chlorowodorku estru acetylometylowego kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*S*-2,3-diaminopropanowego 12

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 150mg związku 12, wyd. 89%.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, D_2O): δ 2,2 (s, 3H, COCH₃); 3,8 (s, 3H, COOCH₃); 4,5 (t, 2H, NH₂); 5,05 (s, 2H, COOCH₂CO); 6,75 (d, 1H, HC=, J = 75Hz); 7,04 (d, 1H, HC=, J = 75Hz). ESI-Q-TOF MS m/z 273.1083 [M+H]⁺

7.9.5. Synteza chlorowodorku estru 3-butan-2-onu *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*S*-2,3-diaminopropanowego 13

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 111mg związku 13, wyd. 78%.

$^1\text{H NMR}$ (500Hz, D_2O): δ 1.89 (s, 3H, CH₂COCH₃); 2.15 (m, 1H, COOCH(CH₃)CO); 3.63 (s, 3H, CH₃O); 3.55 (dd, 2H, NHCH₂CH); 3.73 (t, 1H, CHNH); 4.75 (s, 2H, OCH₂C(O)CH₃); 6.71(ABq, 2H, CH=CH). ESI-Q-TOF MS m/z 287.123 [M+H]⁺

7.9.6. Synteza chlorowodorku estru 3,3-dimetylo-2-okso-butyloвого *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*S*-2,3-diaminopropanowego 14

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 111mg związku 14, wyd. 65%

$^1\text{H NMR}$ (200Hz, D_2O): δ 1.06 (s, 9H, COC(CH₃)₃); 3.68 (s, 3H, CH₃O); 3.84 (dd, 2H, NHCH₂CH); 4.41 (m, 1H, CH₂CHNH); 5.16 (s, 2H, OCH₂C(O)CH₃); 6.83 (ABq, 2H, CH=CH). ESI-Q-TOF MS m/z 315.1593 [M+H]⁺

7.10. Otrzymywanie ketoestrowych pochodnych BADP.

7.10.1. Synteza estru acetylometylowego kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-(S)-N³-[(E)-4-fenylo-oksobutenoilo]aminopropanowego 15a

0,362g Boc-BADP (1mmol) rozpuszczono w 10ml metanolu i 1ml wody, następnie miareczkowano 20% wodnym roztworem Cs₂CO₃, aż do uzyskania pH roztworu ok. 7. Otrzymaną sól odparowano do sucha, po czym rozpuszczono w 6ml DMFu. Do kolby wkroplono powoli 0,08ml (1mmol) chloroacetonu, i mieszano w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Po tym czasie odparowano część DMFu, a pozostałość rozpuszczono w wodzie destylowanej i ekstrahowano trzykrotnie 30ml porcjami octanu etylu. Warstwy organiczne połączono i suszono za pomocą bezwodnego MgSO₄. Po odparowaniu octanu etylu, otrzymany olej oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej z żelom krzemionkowym jako fazą stacjonarną w układzie chlorek metylenu: aceton 6:1 (v/v). Krystalizowano z układu octan etylu: eter naftowy, otrzymując 100mg czystego związku. (wyd. 24%) TLC (ukł. 1) R_f=0,84

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1,44 (s, 9H, 3x(CH₃)); 2,3 (s, 3H, CH₃CO); 3,68 (t, 2H, CH₂NH), 4,15 (m, 1H, CH), 5,27 (q, 1H, CH₃CHCO) 6,03 (d, 1H, CONH); 7,04 (t, 1H, CONH), 5,95 (d, 1H, HC=); 6,6 (d, 1H, HC=); 7,5 (m, 3H, Ph), 8,03 (m, 2H, Ph).

7.10.2. Synteza estru 1-metylo-2-oksopropylowego kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-(S)-N³-[(E)-4-fenylo-4-oksobutenoilo]aminopropanowego 16a

0,362 g (1 mmol) kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-(S)-N³-[(E)-4-fenylo-4-oksobutenoilo]aminopropanowego rozpuszczono w 10ml MeOH i 1 ml wody, następnie miareczkowano 20% roztworem wodnym CsCO₃, aż do otrzymania roztworu o pH = 7. Tak otrzymaną sól cezową odparowano do sucha, po czym rozpuszczono ją w 5 ml DMF. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 0,1 ml (1mmol) 3-chloro-2-butanonu, a reakcję prowadzono przez 48 godzin. Po tym czasie odparowano część DMFu, pozostałość rozpuszczono w wodzie i ekstrahowano 3-krotnie 10ml porcjami octanu etylu. Warstwy organiczne połączono, suszono nad MgSO₄, a następnie odparowano rozpuszczalnik do oleju. Analiza TLC wykazała obecność zanieczyszczeń, zatem zastosowano chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym w układzie chlorek metylenu:aceton 3,5:1 (v/v). Produkt otrzymano w formie żółtego osadu amorficznego osadu. TLC (1) R_f=0,91

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1,44 (s, 9H, $3\times(\text{CH}_3)$); 2,3 (s, 3H, CH_3O); 3,68 (t, 2H, CH_2NH), 4,15 (m, 1H, CH), 5,27 (q, 1H, CH_3CHCO) 6,03 (d, 1H, CONH); 7,04 (t, 1H, CONH), 6,95 (d, 1H, $\text{HC}=\text{}$); 7,03 (d, 1H, $\text{HC}=\text{}$); 7,6 (m, 3H, Ph), 8,03 (m, 2H, Ph).

7.10.3. Synteza estru 3,3-dimetylo-2-okso-butylowego kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo-(S)- N^3 -[(E)-4-fenyl-oksobutenoil]aminopropanowego 17a

0,362g Boc-BADP (1mmol) przeprowadzono sól cesowa przy użyciu węglanu cezu, a następnie rozpuszczono w 6ml DMFu. Do mieszniny reakcyjnej dodano 0,131ml (1mmol) chloropinakolonu, i mieszano w temperaturze pokojowej przez 72 godzin. Po tym czasie odparowano część DMF, a pozostałość rozpuszczono w wodzie destylowanej i ekstrahowano trzykrotnie 30ml porcjami octanu etylu. Warstwy organiczne połączono i suszono za pomocą bezwodnego MgSO_4 . Po odparowaniu octanu etylu, otrzymany olej oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej z żelem krzemionkowym jako fazą stacjonarną w układzie chlorek metylenu: aceton 9:1 (v/v). Otrzymano 120mg żółtego oleju z wyd. 26%) TLC (ukł.3) $R_f=0,52$

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1,41 (s, 9H, $3\times(\text{CH}_3)$); 1,62 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3,68 (t, 2H, CH_2NH), 4,15 (m, 1H, CH), 4,9 (s, 1H, CH_2CO), 5,27 (q, 1H, CH_3CHCO) 6,03 (d, 1H, CONH); 7,04 (t, 1H, CONH), 5,9 (d, 1H, $\text{HC}=\text{}$); 6,45 (d, 1H, $\text{HC}=\text{}$); 7,7 (m, 3H, Ph), 8,1 (m, 2H, Ph).

7.10.4. Synteza chlorowodorku estru acetylometylowego kwasu N^3 -[(E)-4-fenyl-4-oksobutenoil]- (S)-2,3- aminopropanowego 15

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 86mg związku, wyd. 92%.

^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ 2,18 (s, 3H, $(\text{CO})\text{CH}_3$); 4,5 (t, 2H, $\text{CH}-\text{CH}_2$); 5,05 (s, 2H, COOCH_2CO); 6,95 (d, 1H, $\text{HC}=\text{}$); 7,84 (d, 1H, $\text{HC}=\text{}$); 7,56-7,9 (m, 5H, Ph).

7.10.5. Synteza chlorowodorku 1-metylo-2-oksopropylowego kwasu N^3 -[(E)-4-fenyl-4-oksobutenoil]- (S)-2,3- aminopropanowego 16

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 80mg związku, wyd. 71%.

^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ 1,44 (d, 1H, $\text{COOCH}(\text{CH}_3)\text{CO}$); 1,8 (s, 3H, $(\text{CO})\text{CH}_3$); 4,5 (t, 2H, $\text{CH}-\text{CH}_2$); 5,25 (q, 1H, $\text{COOCH}(\text{CH}_3)\text{CO}$); 5,95 (d, 1H, $\text{HC}=\text{}$); 6,4 (d, 1H, $\text{HC}=\text{}$); 7,56-7,9 (m, 5H, Ph).

7.10.6. Synteza chlorowodoru estru 3,3-dimetylo-2-okso-butylowego kwasu N^3 -[(E)-4-fenyl-4-oksobutenoil]- (S)-2,3-aminopropanowego 17

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 86mg związku, wyd. 88%.

^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ 0,96 (s, 9H, $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$), 3,65 (d, 2H $\text{CH}-\text{CH}_2$); 4,15 (t, 2H, $\text{CH}-\text{CH}_2$); 4,95 (s, 2H, COOCH_2CO); 5,95 (d, 1H, $\text{HC}=\text{}$); 6,84 (d, 1H, $\text{HC}=\text{}$); 7,46-7,9 (m, 5H, Ph).

7.11. Otrzymywanie estrowych koniugatów z glikolamidami.

7.11.1. Synteza koniugatu kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo-(S)- N^3 -[(2E)-3-(2-fenyl-1,3-dioxolan-2-yl)-2-propenowego]-2,3-diaminopropanowego z glikolamidem (Boc-BADP- $\text{OCH}_2\text{CONH}_2$).25a

362mg (0,0001mol) Boc BADP i 75mg (0,0001mol) glikolamidu rozpuszczono w 5ml CH_2Cl_2 i dodano katalityczną ilość DMAP 10mg. Mieszaninę reakcyjną schłodzono do ok. 0°C i wkroplono 226mg DCC rozpuszczone w 2ml CH_2Cl_2 . Po zakończeniu reakcji (24 h), przeniesiono do rozdzielacza i przemyto NaHSO_4 , wodą, 5% NaHCO_3 , i kilkoma porcjami wody do $\text{pH}=7$, a warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO_4 . Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika, konieczne było oczyszczenie związku przez chromatografię kolumnową w układzie 50:1 (v/v) octan etylu:metanol, fazą stacjonarną był żel krzemionkowy. Otrzymano 210mg produktu (wyd.50%). $R_f=0,78$ (ukł.1)

^1H (200MHz, DMSO) 1,39 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$); 3,35 (m, 2H, CH_2CH); 4,48 (t, 1H, CHNH), 6,91(d, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 7,8 (d, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 7,7 (m, 5H, Ph), 8,05 (s, 2H, CONH_2)

7.11.2. Synteza koniugatu kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo-(S)- N^3 -[(2E)-3-(2-fenyl-1,3-dioxolan-2-yl)-2-propenowego]-2,3-diaminopropanowego. (Boc-BADP- $\text{OCH}_2\text{CONHCH}_3$).26a

Związek otrzymano zgodnie z procedurą jak dla pochodnej 25a, z Boc BADP 309mg (0,00085mol) z 76mg (0,00085mol) N-metyloglikolamidu. Uzyskano 227mg produktu. TLC (ukł.1) $R_f=0,75$

^1H (200MHz, DMSO) 1,39 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$); 2,32 (s, 3H, CONHCH_3); 3,35 (m, 2H, CH_2CH); 4,44 (t, 1H, CHNH), 6,8(d, 1H, CH=), 7,6 (d, 1H, CH=), 7,7 (m, 5H, Ph), 8,05 (s, 2H, CONH_2)

7.11.3. Synteza koniugatu kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo-(S)- N^3 -[(2E)-3-(2-fenylo-1,3-dioksolan-2-ylo)-2-propenowego]-2,3-diaminopropanowego.
(Boc-BADP- $\text{OCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_3)_2$) 27a

Związek otrzymano zgodnie z procedurą jak dla pochodnej 25a Boc BADP 145mg (0,0004mol) z 42mg (0,0004mol) N,N-dimetyloglikolamidu Uzyskano 212mg produktu. TLC (ukł.1) $R_f=0,75$

^1H (200MHz, DMSO) 1,39 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$); 2,65 (s, 3H, CONHCH_3); 3,2 (m, 2H, CH_2CH); 3,52(m, 2H, CH_2CH); 4,4 (t, 1H, CHNH), 6,87(d, 1H, CH=), 7,5 (d, 1H, CH=), 7,7 (m, 5H, Ph),

7.11.4. Synteza chlorowodoru koniugatu kwasu N^3 -[(E)-4-fenylo-4-oksobutenoilo]- (S)-2,3- aminopropanowego z glikolamidem. (BADP- $\text{OCH}_2\text{CONH}_2$).25

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 25mg związku, wyd. 65%.

^1H (200MHz, DMSO) 3,35 (m, 2H, CH_2CH); 4,48 (t, 1H, CHNH), 6,91(d, 1H, CH=), 7,8 (d, 1H, CH=), 7,7 (m, 5H, Ph), 8,05 (s, 2H, CONH_2)

7.11.5. Synteza chlorowodoru koniugatu kwasu N^3 -[(E)-4-fenylo-4-oksobutenoilo]- (S)-2,3- aminopropanowego z N-metyloglikolamidem (BADP- $\text{OCH}_2\text{CONHCH}_3$). 26.

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 227 mg związku, wyd. 91%.

^1H (200MHz, DMSO) 2,9 (s, 3H, CONHCH_3); 3,6 (m, 2H, CH_2CH); 4,5 (t, 1H, CHNH), 6,8(d, 1H, CH=), 7,6 (d, 1H, CH=), 7,7 (m, 5H, Ph), 8,2 (s, 2H, CONH)

7.11.6. Synteza chlorowodoru koniugatu kwasu N^3 -[(E)-4-fenyl-4-oksobutenoilo]- (S)-2,3-aminopropanowego z N,N-dimetyloglikolamidem Boc-BADP-OCH₂CONH(CH₃)₂. 27

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 82 mg związku, wyd. 74%.

¹H (200MHz, DMSO) 2,80 (s, 3H, CONHCH₃); 2,86 (s, 3H, CONHCH₃); 3,5 (m, 2H, CH₂CH); 4,44 (t, 1H, CHNH), 6,91(d, 1H, CH=), 7,8 (d, 1H, CH=), 7,7 (m, 5H, Ph),

7.12. Otrzymywanie koniugatów FMDP z hydroksyamidami.

7.12.1. Synteza koniugatu kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego z glikolamidem.

0,4g (1,33mmola) kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego i 0,1 g (1,33mmola) glikolamidu rozpuszczono w 20 ml dioksanu, następnie schłodzono w łaźni lodowej. Do mieszaniny reakcyjnej wkroplono 0,27 g DCC (1,33mmola) w 5ml dioksanu. Po 18 godzinach zaobserwowano wytrącający się osad DCU, który następnie odsączono, a kolbkę z przesączem umieszczono w lodówce. Następnie odsączono kolejną porcję wytrąconego osadu DCU, a przesącz odparowano do sucha. Analiza TLC (1) wykazała obecność zanieczyszczeń, które zostały usunięte za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie chlorek metylenu: aceton 4:1 (v/v). Otrzymano 0,21 (42%) białego osadu Boc-FMDP-glikolamidu TLC (1) $R_f=0,93$.

¹H NMR (200Hz, CDCl₃): δ 1.4 (s, 9H, (CH₃)₃CO); 3.7 (m, 2H, NHCH₂CH); 3.8 (s, 3H, CH₃O); 4.1 (m, 1H, CONHCH₂); 4.5 (m, 1H, COOCH₂CO); 5.8 (m, 1H, NHOCOC(CH₃)₃); 6.9 (ABq, 2H, CH=CH, $J=15.5$); 7.26 (m, 2H, CONH₂).

7.12.2. Synteza N-metyloglikolamidu koniugatu kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego z N-metyloglikolamidem.

0,337g (0,0011mola) Boc FMDP, 0,1 g (0,0011mola) N-metyloglikolamidu i 0,02g DMAP rozpuszczono w 5ml CH₂Cl₂. Mieszaninę reakcyjną nieznacznie schłodzono i wkroplono 0,297g (0,0013mola) DCC, reakcję prowadzono przez 4 godziny, po tym czasie

odsączono wytrącony osad DCU, zatężono i pozostawiono na noc w lodówce. Odsączono kolejną porcję wytrąconego DCU, a następnie rozpuszczono w CH_2Cl_2 i płukano wodą, 1M NaHSO_4 , 5% NaHCO_3 i wodą do $\text{pH}=7$, a następnie warstwę organiczną suszono nad bezw. MgSO_4 . Po usunięciu środka suszącego odparowano do sucha, a następnie rozpuszczono w niewielkiej ilości octanu etylu i krystalizowano przez dodatek eteru dietylowego. Uzyskano 250mg białych kryształów związku (wyd. 58%). TLC (ukł.1) $R_f=0,72$

^1H NMR (500Hz, CDCl_3): δ 1.42 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$); 2.78 (s, 3H, CONHCH_3); 3.79 (s, 3H, CH_3O); 3.85 (m, 2H, NHCH_2CH); 4.12 (m, 1H, CONHCH_2); 4.3 (m, 1H, $\text{CHNHCO}(\text{CH}_3)_3$); 4.6 (s, 2H, COOCH_2CO); 5.89 (m, 1H, $\text{NHOCOC}(\text{CH}_3)_3$); 6.85 (ABq, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J=15.5$); 7.41 (m, 1H, CONHCH_3).

7.12.3.Synteza koniugatu kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego z N,N-dimetyloglikolamidem.

0,510g (1,7mmola) BocFMDP, 0,175g (1,7mmola) N,N-dimetyloglikolamidu i 0,02g (0,2mmola) DMAP rozpuszczono w 5 ml THF. Mieszaninę schłodzono i wkroplono powoli 0,44g (2,1mmola) DCC rozpuszczonego w 2 ml THFu. Następnie reakcja była prowadzona w temperaturze pokojowej przez 24h. Po tym czasie odsączono osad wytrącającego się DCU, następnie odparowano THF i rozpuszczono w CH_2Cl_2 , po czym płukano 1M roztworem NaHSO_4 , wodą, 5% NaHCO_3 , i kilkoma porcjami wody, aż do $\text{pH}=7$, a warstwę organiczną suszono bezw. MgSO_4 . Po odsączeniu środka suszącego, odparowano nadmiar octanu etylu, a pozostałość krystalizowano z mieszaniny octan etylu: eter dietylowy. Otrzymano 0,271g białych kryształów związku (wyd.41%). Analiza TLC AcOEt: Et₂O 4:1 v/v $R_f=0,62$.

^1H NMR (500Hz, CDCl_3): δ 1.22 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$); 3.18 (d, 6H, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$); 3.4 (m, 2H, NHCH_2CH); 3.78 (m, 1H, CONHCH_2); 3.81 (s, 3H, CH_3O); 4.7 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NHBoc})\text{CO}$); 4.81 (s, 2H, COOCH_2CO); 5.72 (m, 1H, $\text{NHOCOC}(\text{CH}_3)_3$); 6.85 (ABq, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J=15.5$).

7.12.4.Synteza chlorowodorku koniugatu kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego z glikolamidem.

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 0.08g, 76%, ^1H NMR (500Hz, D_2O): δ 2.62 (s, 3H, CONHCH_3); 3.66 (s, 3H, CH_3O); 3.82 (dd, 2H, NHCH_2CH ,

$J=5$); 4.35 (t, 1H, CHNH, $J=5$); 6.73 (ABq, 2H, CH=CH, $J=15.6$). ESI-Q-TOF MS m/z 298.1767 [M+H]⁺

7.12.5. Synteza chlorowodoru koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego z N-metyloglikolamidem.

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 0.1 g, 65%. ¹H NMR (500Hz, D₂O): δ 2.62 (s, 3H, CONHCH₃); 3.66 (s, 3H, CH₃O); 3.82 (dd, 2H, NHCH₂CH, $J=5$); 4.35 (t, 1H, CHNH, $J=5$); 4.92 (dd, 2H, CH₂CO $J_3=15.63$, $J_2=19.28$); 6.73 (ABq, 2H, CH=CH, $J=15.6$). ESI-Q-TOF MS m/z 288.119 [M+H]⁺

7.12.6. Synteza chlorowodoru koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego z N,N-dimetyloglikolamidem.

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 0.085 g, 73% ¹H NMR (500Hz, D₂O): δ 2.803 (s, 3H, CONHCH₃); 2.873 (s, 3H, CONHCH₃); 3.659 (s, 3H, CH₃O); 3.76 (dd, 1H, NHCHCH, $J_3=4.5$; $J_2=15.1$); 3.91 (dd, 1H, NHCHCH, $J_3=5.37$, $J_2=15.1$); 4.377 (t, 1H, CHNH, $J=5$); 4.92 (dd, 2H, CH₂CO $J_3=15.63$, $J_2=19.28$); 6.73 (ABq, 2H, CH=CH, $J=15.6$). $[\alpha] = -24.24$ ESI-Q-TOF MS m/z 302.1354 [M+H]⁺

7.12.7. Synteza koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego L-laktamidem.

0,486g Boc FMDP (0,015mol) oraz 0,138g (0,015) rozpuszczono w 5ml THF oraz katalityczna ilość DMAP (0,02g). Mieszaninę reakcyjną mieszano mieszałem magnetycznym i schłodzono do temperatury 0°C i powoli wkroplono 0,33mg DCC. Następnie po 24h czasu reakcji odsączono nadmiar DCU, mieszaninę zatężono w celu wytrącenia pozostałości DCU. Po odsączeniu odparowano do sucha, rozpuszczono w octanie etylu i płukano kolejno 1M NaHSO₄, wodą, 5% NaHCO₃, wodą i NaCl. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu, a następnie krystalizowano z mieszaniny octan etylu:heksan. Otrzymano 380mg białych kryształów związku (24c) (wyd.63%), t.126-128, R_f=0,78 (ukł. 1)

¹H NMR (500Hz, CDCl₃): δ 1,23(s, 9H, (CH₃)₃CO); 1,56 (d, 3H, CH₃CH, $J=4,6$); 3,8 (s, 3H, CH₃O); 4,05 (m, 2H, NHCH₂CH); 4,5 (m, 1H, CHNH); 5,21 (q, 1H, OCHCH₃, $J=5$); 5,75 (m,

1H, CONHCH₂); 6,53 (s, 1H, NHOCOC(CH₃)₃); 6,81(m, 2H, CH=CH); 7,1 (s,1H, CONH₂); 7,6 (s, 1H, CONH₂)

7.12.8.Synteza koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego z N-metylo-L-laktamidem.

Związek otrzymano według procedury wykorzystanej dla syntezy pochodnej . Uzyskano 400mg krystalicznego związku (wyd. 66%), t.t=79-83⁰C, Rf=0,76 (ukł.1).

¹H NMR (500Hz, CDCl₃): δ 1,42 (s, 9H, (CH₃)₃CO); 1,5 (d, 3H, CH₃CH, J=6); 2,84 (d, 3H, CONHCH₃, J=4,5) 3,78 (s, 3H, CH₃O); 3,9 (m, 2H, NHCH₂CH); 4,42 (m, 1H, CHNH); 5,17 (q, 1H, OCHCH₃, J=6); 5,85 (m, 1H, CONHCH₂); 6,8(s, 1H, NHOCOC(CH₃)₃); 6,9(ABq, 2H, CH=CH, J=15,5); 7,43 (m, 1H, CONHCH₃).

7.12.9.Synteza koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego z N,N-dimetylo-L-laktamidem.

Zgodnie z procedura dla związku otrzymano po krystalizacji otrzymano 168mg białego krystalicznego związku (25c) (wyd. 28%), t.t= 96-99, Rf=0,75 (ukł.1) .

¹H NMR (500Hz, CDCl₃): δ 1,44 (s, 9H, (CH₃)₃CO); 1,638 (d, 3H, CH₃CH, J=6); 2,973 (s, 3H, CON(CH₃)₂); 3,136 (s, 3H, CON(CH₃)₂); 3,41 (m, 2H, NHCH₂CH); 3,76 (m, 1H, CHNH) 3,799 (s, 3H, CH₃O); 4,76 (q, 1H, OCHCH₃, J=4); 5,72 (m, 1H, CONHCH₂); 6,83(s, 1H, NHOCOC(CH₃)₃); 6,85(ABq, 2H, CH=CH, J=16).

7.12.10. Synteza chlorowodorku koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroiło)-S -2,3-diaminopropanowego z L-laktamidem.

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 0.28g, 89% ¹H NMR (500Hz, D₂O): δ 1.38 (d, 3H, CH₃CH, J=6); 3.64 (s, 3H, CH₃O); 3.7 (dd, 2H, NHCH₂CH, J=4); 4.3 (m, 1H, CHNH); 5.08 (q, 1H, OCHCH₃, J=6.5); 6.75 (ABq, 2H, CH=CH, J=15). [α]_D= -20.45 ESI-Q-TOF MS m/z 288.1187 [M+H]⁺

7.12.11. Synteza chlorowodoru koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroil)-S-2,3-diaminopropanowego z N-metylo-L-laktamidem

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 0.1g, 75% ¹H NMR (500Hz, D₂O): δ 1.3 (d, 3H, CH₃CH, J=6.6); 2.6 (s, 3H, CONHCH₃); 3.63 (s, 3H, CH₃O); 3.78 (dd, 2H, NHCH₂CH, J=4); 4.31 (m, 1H, CHNH); 5.02 (q, 1H, OCHCH₃, J=6); 6.7(ABq, 2H, CH=CH, J=14.6). [α]_D = -22.74 ESI-Q-TOF MS m/z 302.1354 [M+H]⁺

7.12.12. Synteza chlorowodoru koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroil)-S-2,3-diaminopropanowego z N,N-dimetylo-L-laktamidu.

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6. Uzyskano 0.09 g, 68% ¹H NMR (500Hz, D₂O): δ 1.3 (d, 3H, CH₃CH, J=6.6); 2.8 (s, 3H, CONCH₃); 3.0 (s, 3H, CONCH₃); 3.63 (dd, 2H, NHCH₂CH, J=5); 3.67 (s, 3H, CH₃O); 4.31 (m, 1H, CHNH); 5.02 (q, 1H, OCHCH₃, J=6); 6.7(ABq, 2H, CH=CH, J=15.6). [α]_D = -22,53 ESI-Q-TOF MS m/z 316.7240 [M+H]⁺

7.13. Otrzymywanie koniugatów FMDP z amidami aminokwasów.

7.13.1. Synteza koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroil)-S-2,3-diaminopropanowego z amidem glicyny. 22a

Syntezę prowadzono według metody dla związku z wykorzystaniem 110mg chlorowodoru glicynamidu i 0,072ml NEt₃ i 413mg BocFMDPOSu. Po oczyszczeniu związku z pomocą chromatografii kolumnowej, substancję krystalizowano z mieszaniny octan etylu heksan, uzyskano 292 mg białego, silnie higroskopijnego związku t.t. 143-145°C, R_f=0,59 (ukł. 1), wyd. 53%

¹H NMR (500Hz, CDCl₃): δ 1,44(s, 9H, (CH₃)₃CO); 3,4(m, 2H, NHCH₂CH); 3,67 (m, 1H, CHNH); 3,8 (s, 3H, CH₃O); 4,0 (m, 2H, NHCH₂CO); 5,52 (s, 1H, CONH₂); 6,01 (s, 1H, CONH₂); 6,28 (s, 1H, CONHCH₂CONH₂); 6,9(ABq, 2H, CH=CH); 7,08 (s, 1H, CONHCH₂CH); 7,17 (s, 1H, NHOCOC(CH₃)₃);

7.13.2. Synteza koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego z N-metyloglicynamidem .
23a

Syntezę prowadzono z wykorzystaniem metody dla związku 22a z 69,25mg (0,5mmola) chlorowodorku N-metyloglicynamidu oraz 0,07ml NEt₃ oraz 207,5 mg BocFMDPOSu. Otrzymano 180 mg związku 23a w formie białego proszku t.t.=171-173^oC, Rf=0,64, wyd. 93%.

¹H NMR (500Hz, CDCl₃): δ 1,43(s, 9H, (CH₃)₃CO); 2,8 (d, 3H, CH₂CONHCH₃, J=6); 3,59 (m, 2H, NHCH₂CH); 3,8 (s, 3H, CH₃O); 3,9 (m, 1H, CHNH); 4,24 (m, 2H, NHCH₂CO); 6,31(s,1H, CONHCH₃) 6,58 (s,1H,CONHCH₂CONH₂); 6,91(ABq, 2H, CH=CH); 7,22 (t, 1H, CONHCH₂CH); 7,56 (s, 1H, NHOCOC(CH₃)₃);

7.13.3. Synteza koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego z N,N-dimetyloglicynamidem. 43a

138mg (1mmol) chlorowodorku N,N-dimetyloamidu glicyny i 1mmol NEt₃ rozpuszczono w 3ml THF i 2ml wody, po czym mieszaninę reakcyjną schłodzono do temp. 5^oC, a następnie wkroplono roztwór 413mg (1 mmol) Boc FMDPOSu. Po 24h rozpuszczalniki odparowano do sucha, zawieszono w octanie etylu i odsączono, a osad przepłukano eterem dietylowym. Pozostałe zanieczyszczenia usunięto poprzez chromatografię kolumnową z wykorzystaniem rozpuszczalników w układzie 1:1 octan etylu: metanol. Uzyskano 354mg białego związku 24a , t.t. 172-174^oC, Rf=0,61 (ukł. 1); wyd.89%.

¹H NMR (500Hz, CDCl₃): δ 1,23(s, 9H, (CH₃)₃CO); 1,56 (d, 3H, CH₃CH, J=4,6); 3,8 (s, 3H, CH₃O); 4,05 (m, 2H, NHCH₂CH); 4,5 (m, 1H, CHNH); 5,21 (q, 1H, OCHCH₃, J=5); 5,75 (m, 1H, CONHCH₂); 6,53 (s, 1H, NHOCOC(CH₃)₃); 6,81(ABq, 2H, CH=CH); 7,1 (s,1H, CONH₂); 7,6 (s, 1H, CONH₂)

7.13.4. Synteza chlorowodorku koniugatu kwasu N³-(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego z glicynamidem.

Związek otrzymano zgodnie z procedurą dla związku 6 uzyskano 98 mg.

¹H NMR (500Hz, D₂O): δ 3,66 (s, 3H, CH₃O); 3,7 (dd, 2H, NHCH₂CH,); 3,83(m, 2H, NHCH₂CONH₂); 4,12 (t, 1H, CHNH, J=5,5); 6,72 (ABq, 2H, CH=CH, J=16).

7.13.5. Synteza chlorowodoru koniugatu N-metyloglicynamidu kwasu N³-(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego z N-metyloglicynamidem.

Związek otrzymano według procedury dla związku 6 uzyskano 93mg białego osadu.

¹H NMR (500Hz, D₂O): δ 2,6 (s, 3H, CONHCH₃); 3,66 (s, 3H, CH₃O); 3,68 (dd, 2H, NHCH₂CH, J=4); 3,83 (dd, 2H, NHCH₂CONH₂, J=16); 4,11(t, 1H, CHNH, J=5,5); 6,74 (ABq, 2H, CH=CH, J=16).

7.13.6. Synteza chlorowodoru koniugatu kwasu N³-(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego z N,N-dimetyloglicynamidem.

Związek otrzymano według procedury dla związku 6. Z 300 mg BocFMDPGlyNH(CH₃)₂ uzyskano 250mg białego osadu.

¹H NMR (500Hz, D₂O): δ 2,78 (s, 3H, CONCH₃); 2,86 (s, 3H, CONCH₃); 3,66 (s, 3H, CH₃O); 3,69 (m, 2H, NHCH₂CH, J=5); 4,01 (dd, 2H, NHCH₂CONH₂, J=17); 4,14(t, 1H, CHNH, J=5,5); 6,73 (ABq, 2H, CH=CH, J=16).

7.13.7. Synteza koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego z L-alaninamidem.

Syntezę prowadzono według metody dla związku 43a z wykorzystaniem 110mg chlorowodoru glicynamidu i 0,072ml NEt₃ i 413mg BocFMDPOSu. Po oczyszczeniu związku z pomocą chromatografii kolumnowej, substancję krystalizowano z mieszaniny octan etylu heksan, uzyskano 292 mg białego, silnie higroskopijnego związku t.t. 143-145^oC, Rf=0,59 (ukł. 1), wyd. 53%

¹H NMR (500Hz, CDCl₃): δ 1.41 (d, 3H, CH₃CH, J=4,6); 1,45 (s, 9H, (CH₃)₃CO); 1,59 (s, 1H, CONHCHCONH₂); 3,78 (m, 2H, NHCH₂CH); 3,81 (s, 3H, CH₃O); 4,25 (m, 1H, CHNH); 4,48 (m, 2H, NHCHCO); 5,4 (s, 1H, CONHCH₂CH); 6,13 (s, 1H, CONH₂); 6,47 (s, 1H, CONH₂); 6,88(ABq, 2H, CH=CH); 6,98 (s, 1H, NHOCOC(CH₃)₃);

7.13.8. Synteza koniugatu kwasu N²-tert-butoksykarbonylo-N³-(4-metoksyfumaroylo)-S-2,3-diaminopropanowego N-metylo-L-alaninamidu.

Syntezę prowadzono z wykorzystaniem metody dla związku 23c z 69,25mg (0,5mmola) chlorowodoru N-metyloglicynamidu oraz 0,07ml NEt₃ oraz 207,5 mg

BocFMDPOSu. Otrzymano 180 mg związku 22c w formie białego proszku t.t=171-173, Rf=0,64, wyd. 93%.

^1H NMR (500Hz, CDCl_3): δ 1.35 (d, 3H, CH_3CH , $J=$); 1,45(s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$); 2,79 (d, 3H, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_3$, $J=$); 3,73 (m, 2H, NHCH_2CH); 3,8 (s, 3H, CH_3O); 4,29 (m, 1H, CHNH); 4,45 (m, 1H, NHCHCO); 6,21(s,1H, CONHCH_3), 6,67 (s,1H, CONHCHCONH); 6,92(ABq, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$); 7,12 (m, 1H, CONHCH_2CH); 7,52 (s, 1H, $\text{NHOCOC}(\text{CH}_3)_3$);

7.13.9.Synteza koniugatu kwasu N^2 -tert-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego N,N-dimetylo-L-alaninamidu.

138mg (1mmol) chlorowodorku N,N-dimetyloamidu glicyny i 1mmol NEt_3 rozpuszczono w 3ml THF i 2ml wody, po czym mieszaninę reakcyjną schłodzono do temp. 50C, a następnie wkroplono roztwór 413mg (1 mmol) Boc FMDPOSu. Po 24h rozpuszczalniki odparowano do sucha, zawieszono w octanie etylu i odsączono, a osad przepłukano eterem dietylowym. Pozostałe zanieczyszczenia usunięto poprzez chromatografię kolumnową z wykorzystaniem rozpuszczalników w układzie 1:1 octan etylu : metanol. Uzyskano 354mg białego związku 23c, t.t. 172-174 $^{\circ}\text{C}$, Rf=0,61 (ukł. 1); wyd.89%.

^1H NMR (500Hz, CDCl_3): δ 1.35 (d, 3H, CH_3CH , $J=$); 1,42 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$); 2,95(s,3H, CONCH_3); 3,09 (s,3H, CONCH_3), 3,67 (m, 2H, NHCH_2CH); 3,79 (s, 3H, CH_3O); 4,28 (m, 1H, CHNH); 4,28 (m, 1H, CH_3CH ,); 4,81 (m, 1H, OCHCH_3 ,); 5,63 (d, 1H, CONHCH); 6,89(ABq, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$); 7,05 (s,1H, CONHCH_2);); 7,16 (s, 1H, $\text{NHOCOC}(\text{CH}_3)_3$);

7.13.10. Synteza koniugatu chlorowodorku L-alaninamidu kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego z L-alaninamidu.

W celu usunięcia grupy zabezpieczającej *tert*-butoksykarbonylowej z 180 mg Boc FMDPGlyNH₂, związek traktowano 3ml 4M HCl w dioksanie, reakcję prowadzono przez 3 godziny. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną odparowano do sucha, a następnie dwukrotnie odparowywano z dodatkiem eteru dietylowego. Strącony produkt w postaci białego osadu odsączono i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymano 98 mg FMDPGlyNH₂*HCl (24).

^1H NMR (500Hz, D_2O): δ 1.35 (d, 3H, CH_3CH , $J=6$); 3.6 (s, 3H, CH_3O); 3.9 (dd, 2H, NHCH_2CH , $J=4$); 4.3 (m, 1H, CHNH); 5.08 (q, 1H, NCHCH_3 , $J=6.5$); 6.75 (ABq, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J=15$).

7.13.11. Synteza koniugatu chlorowodoru N-metylo-L-alaninamidu kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego z N-metylo-L-alaninamidem.

Syntezę przeprowadzono według procedury dla związku 21. Z 120 mg BocFMDPGlyNHCH₃ otrzymano 93mg białego osadu

^1H NMR (500Hz, D_2O): δ 1.3 (d, 3H, CH_3CH , $J=6.6$); 2.6 (s, 3H, CONHCH_3); 3.63 (s, 3H, CH_3O); 3.78 (dd, 2H, NHCH_2CH , $J=4$); 4.31 (m, 1H, CHNH); 5.02 (q, 1H, OCHCH_3 , $J=6$); 6.7(ABq, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J=14.6$)

7.13.12. Synteza koniugatu chlorowodoru kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-S-2,3-diaminopropanowego z N,N-dimetylo-L-alaninamidem

Syntezę przeprowadzono według procedury dla związku 21. Z 300 mg BocFMDPGlyNH(CH₃)₂ (23c) otrzymano 250mg białego osadu FMDPGlyN(CH₃)₂*HCl (25)

^1H NMR (500Hz, D_2O): δ 1.3 (d, 3H, CH_3CH , $J=6.6$); 2.8 (s, 3H, CONCH_3); 3.0 (s, 3H, CONCH_3); 3.64 (dd, 2H, NHCH_2CH , $J=5$); 3.67 (s, 3H, CH_3O); 4.3 (m, 1H, CHNH); 5.02 (q, 1H, NCHCH_3 , $J=6$); 6.7(ABq, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$, $J=15.6$).

7.14. Wyznaczanie aktywności przeciwgrzybowej otrzymanych związków.

Podłoża stosowane w hodowli

W badaniach wykorzystano podłoża płynne i stałe, których skład i sposób przygotowania zestawiono poniżej.

Podłoże YPG (glukoza 20 g/L, ekstrakt drożdżowy 10 g/L, pepton 10 g/L), w podłożu stałym stosowano dodatek agaru mikrobiologicznego (25 g/L).

Podłoże YNB z siarczanem amonu (YNB-SA), pH 5.4 ± 0.2 (glukoza 20 g/L, YNB bez aminokwasów, z siarczanem amonu 6,7 g/L).

Aktywność przeciwgrzybową pochodnych FMDP i BADP, a także związków kontrolnych określano poprzez wyznaczenie najmniejszego stężenia związku powodującego zahamowanie wzrostu komórek grzybowych w 50% i 80%, odpowiednio MIC₅₀ i MIC₈₀, metodą podwójnych seryjnych rozcieńczeń. Badanie prowadzono w sterylnych 96-studzienkowych mikroplątkach w płynnych podłożach: YNB-SA oraz w podłożu zmodyfikowanym z dodatkiem N-acetyloglukozaminy.

Po całonocnej hodowli (16-18h) na podłożu stałym YPG (YNB-SA w przypadku mutantów spontanicznych) komórki badanego szczepu zawieszano w sterylnej wodzie destylowanej. Po ustawieniu gęstości optycznej zawiesiny OD₆₆₀ na poziomie około 0,1 (co odpowiada 10⁶ komórek w 1 mL zawiesiny), inoculum rozcieńczano 50-krotnie, do uzyskania gęstości komórek wynoszącą 2×10^4 komórek w 1 mL zawiesiny.

Roztwory badanych związków przygotowywano w dwukrotnie stężonych podłożach. Do studzienek pierwszego rzędu mikroplątki dodawano 200 µL przygotowanych roztworów związków, a do studzienek rzędów 2-10 po 100 µL odpowiednich podłoży. Po wykonaniu seryjnych rozcieńczeń, do studzienek 1-10 dodawano po 100 µL zawiesiny komórek. Studzienka 11, do której dodano 100 µL podłoża i 100 µL inoculum, stanowiła kontrolę hodowli. Studzienka 12 natomiast, do której dodano 100 µL podłoża i 100 µL sterylnej wody destylowanej, stanowiła kontrolę podłoża. Po dodaniu 100 µL inoculum (przygotowanego w wodzie destylowanej) lub wody destylowanej uzyskiwano we wszystkich studzienkach właściwe stężenie składników pożywki.

Płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 24 h. Gęstość optyczną hodowli odczytano za pomocą czytnika mikroplitek Victor³ przy długości fali $\lambda = 531$ nm. Za MIC₅₀ oraz MIC₈₀ przyjmowano najniższe stężenie związku powodujące odpowiednio 50% i 80% spadek wartości absorbancji w stosunku do kontroli hodowli (wartość absorbancji mniejszą lub równą odpowiednio 50% i 20% wartości absorbancji kontroli hodowli). Badania wykonywano przynajmniej w trzech niezależnych powtórzeniach.

7.15. Określanie szybkości transportu pochodnych FMDP i związków referencyjnych

Całonocną hodowlę komórek odświeżano w podłożu YPG do gęstości optycznej zawiesiny, OD₆₆₀ w przedziale 0,1 ÷ 0,15. Hodowlę prowadzono w wytrząsarce (180 rpm), w temp. 30°C, do osiągnięcia OD₆₆₀ ok. 3,0 tak by uzyskać komórki w logarytmicznej fazie wzrostu. Po upływie ok. 3 h zawiesinę odwirowywano (3 tys. rpm, 5 min) i dwukrotnie przemywano 50 mM buforem fosforanowo-potasowym o pH 5.0. Po ostatnim wirowaniu komórki zawieszano w 1% roztworze glukozy w 50 mM buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0 i ustalano OD₆₆₀ zbliżone do wartości 1,0.

Do trzech 50 mL kolbek dodawano po 5 mL zawiesiny komórek w 1% roztworze glukozy w buforze fosforanowo-potasowym, a następnie inkubowano w cieplarni w temp. 30°C z intensywnym wstrząsaniem. Po upływie 15 min, do kontroli hodowli dodawano 50 μ L wody destylowanej, do próbki badanej 50 μ L roztworu peptydu o stężeniu 5 mM (końcowe stężenie peptydu wynosiło 50 μ M), a do kontroli transportu 50 μ L roztworu azydki sodu o stężeniu 5 mM (końcowe stężenie NaN₃ wynosiło 50 μ M).

Zaraz po sporządzeniu (czas 0) powyższych mieszanin pobierano 1 mL i наносzono na filtry szklane Whatmana GF/A w celu oddzielenia komórek. W określonych odstępach czasu (punkty czasu: 10 min, 30 min, 60 min) czynność powtarzano prowadząc ciągłą inkubację zawiesin w 30°C z wytrząsaniem. W celu oznaczenia stężenia peptydów w przesączach przygotowano krzywą wzorcową. Do 100 μ L uzyskanych przesączy oraz roztworów peptydu dodano 125 μ L odczynnika sporządzonego przez zmieszanie roztworu TNBS (4 mg/mL) z 5% roztworem tetraboranu sodu w stosunku 1 : 4, a następnie inkubowano 30 min w temp. 37°C.

Po inkubacji odczytywano absorbancję przy długości fali $\lambda = 405$ nm przy pomocy czytnika mikroplitek Victor³. Korzystając z zależności absorbancji mieszanin od stężenia

peptydu w wodzie (krzywa wzorcowa) sporządzono wykresy przedstawiające zmiany stężenia peptydu w przesączach w czasie inkubacji.

7.16. Wyznaczanie inhibicji enzymu

Oczyszczanie syntazy glukozaminy-6-fosforanu *C. albicans* produkowanej w *E. coli* przeprowadzono zgodnie z opisaną wcześniej metodą. Stężenie białka oznaczano zgodnie ze zmodyfikowaną procedurą Elsona-Morgana. Standardowa mieszanina testowa składała się z 7,5 mM D-fruktozo-6-fosforan, 10 mM L-glutaminy, 25 mM buforu fosforanu potasu (pH 6,9-7,1), inhibitora w odpowiednim stężeniu i 1-4 µg enzymu syntazy GlcN-6-P w całkowitej objętości 400 µl mieszaniny inkubacji.

Zahamowanie aktywności syntazy glukozamino-6-fosforanu:

Oznaczenia IC_{50} wykonywano w sposób opisany wcześniej. Roztwór inhibitora preinkubowano w standardowej mieszaniny przez 30 minut w 37°C. Reakcję zakończono przez ogrzewanie w temperaturze 100°C przez 1 min. FMDP i BADP wykorzystano jako inhibitory odniesienia.

8. SPIS TABEL

Tabela 1. Czynniki ryzyka inwazyjnej kandydozy.....	7
Tabela 2 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa amidów FMDP i BADP.....	35
Tabela 3 Wyniki inhibicji syntazy glukozy-6-fosforanu przez amidy FMDP i BADP. ...	35
Tabela 4 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ketoestrowych pochodnych FMDP i BADP.	45
Tabela 5 Wyniki aktywności związku 17 w podłożu RPMI oraz minimalnym z dodatkiem NAG	46
Tabela 6 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa koniugatów estrowych FMDP i BADP z hydroksyamidami.	54
Tabela 7 Aktywność inhibicyjna koniugatów FMDP i BADP z amidami hydroksykwasów..	55
Tabela 8 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa koniugatów FMDP z amidami aminokwasów	58
Tabela 9 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa glicynamidów i glikolamidów FMDP wobec mutantów delecyjnych <i>C. albicans</i>	59
Tabela 10 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa koniugatów FMDP z L-laktamidami i glicynamidami wobec mutantów delecyjnych	59

9. SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1 Rys historyczny poszukiwania leków przeciwgrzybowych.....	8
Rysunek 2 Schemat głównych celów molekularnych w terapii przeciwgrzybowej.....	9
Rysunek 3 Struktury związków należących do grupy echinokandyn.....	13
Rysunek 4 Struktury chemiczne innych inhibitorów syntazy glukanu	14
Rysunek 5 Struktury inhibitorów syntazy chityny	15
Rysunek 6 Inhibitory anhidrazy węglanowej.....	16
Rysunek 7 Szlak biosyntezy heksozoamin	21
Rysunek 8 Reakcja katalizowana przez GlmS.	23
Rysunek 9 Mechanizm inhibicji enzymu syntazy GlcN-6-P przez cząsteczkę FMDP	25
Rysunek 10 Schemat syntezy Boc-FMDP i Boc- BADP	29
Rysunek 11 Schemat reakcji w metodzie mieszanych bezwodników.	31
Rysunek 12 Schemat syntezy amidów FMDP.....	32
Rysunek 13 Schemat ataku cząsteczki amoniaku na Boc BADP	32
Rysunek 14 Schemat syntezy ketalu Boc-BADP	33
Rysunek 15 Schemat syntezy amidu BADP	33
Rysunek 16 Schemat syntezy N-metylo (10) i N,N-dimetyloamidu BADP (11)	34
Rysunek 17 Oddziaływania pierwszorzędowego amidu FMDP z enzymem syntazą GlcN-6-P	36
Rysunek 18 Oddziaływania drugorzędowego amidu FMDP z aminokwasami centrum aktywnego enzymu syntazy GlcN-6-P	37
Rysunek 19 Schemat syntezy estru acetylometylowego FMDP.....	42
Rysunek 20 Schemat estrów FMDP otrzymanych w reakcji FMDP z 3-chloro-butan-2-onem (13) i chloropinakolonem (14).....	42
Rysunek 21 Schemat syntezy pochodnych ketoestrowych z BADP	43
Rysunek 22 Oddziaływania ketoestrowych pochodnych FMDP z centrum aktywnym syntazy GlcN-6-P.....	47
Rysunek 23 Mechanizm reakcji otrzymywania estrów kwasu glikolowego(lit)	50
Rysunek 24 Schemat syntezy estru metylowego kwasu glikolowego i odpowiednich glicynamidów	51
Rysunek 25 Schemat syntezy glicynamidów FMDP i BADP.....	51
Rysunek 26 Schemat syntezy estrowych konigatów FMDP z L-latamidami.....	52

Rysunek 27 Schemat syntezy amidów glicyny. $i\text{-NH}_3$ w MeOH/THF	55
Rysunek 28 Schemat syntezy koniugatu FMDP glicynamidem. I-DCC/HOSu,.....	57
Rysunek 29 Schemat syntezy koniugatu FMDP z N-metyloglicynamidu.....	57
Rysunek 30 Schemat syntezy koniugatów FMDP z L-alaninamidami.....	58

10.SPIS DOROBKU NAUKOWEGO

Publikacje

- Dorota Pawlak; Magdalena Stolarska; Ryszard Andruszkiewicz; Marek Wojciechowski. Synthesis, anticandidal activity of N³-(4-methoxyfumaroyl)-(S)-2,3-diaminopropanoic amide derivatives - novel inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase. *European Journal of Medicinal Chemistry* 90 (2015) 577-582;
- Dorota Pawlak, Marta Schielmann, Marek Wojciechowski, Ryszard Andruszkiewicz. Synthesis and biological activity of novel ester derivatives of N³-(4-methoxyfumaroyl)-(S)-2,3-diaminopropanoic acid containing amide and keto function as inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15 (2016) 3586-9.

Doniesienia konferencyjne:

- Dorota Pawlak; Ryszard Andruszkiewicz; Synteza nowych pochodnych inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu. I Ogólnopolska Konferencja Studentów i Doktorantów Nauk Ścisłych CZŁOWIEK NAUKA ŚRODOWISKO; 21-22.07.2012, Gdańsk (prezentacja ustna)
- Dorota Pawlak; Magdalena Stolarska; Ryszard Andruszkiewicz; Synthesis and antimicrobial activity of new glucosamine-6-phosphate synthase inhibitors. VII Joint Meeting on Medicinal Chemistry; 30.06.2013-4.07.2013 Lublin (poster)
- Dorota Pawlak; Magdalena Stolarska; Ryszard Andruszkiewicz; Synthesis and biological activity of new glucosamine-6-phosphate synthase inhibitors. XV Ogólnopolskie Akademickie Seminarium Studentów Biotechnologii & V International Conference of Biotechnology Students; 22-24.11.2013; Wrocław (prezentacja ustna)
- Dorota Pawlak; Ryszard Andruszkiewicz; Marta Schielmann; Synthesis and biological activity of N³-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid (FMDP) glycolamides and lactamides; IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku; 11.05.2014-15.05.2014 Korytnica k/Szydłowa (poster)



11.LITERATURA:

- ¹
- ² Borowski, E., (2000) Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *Farmaco*, 55(3),206–8.
- ³ Hawksworth,D.,(2001).The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol.Res.* 105, 1422–1432.
- ⁴ Horn, F., Heinekamp, T., Kniemeyer, O., Pollmächer J, i in. (2012) Systems biology of fungal infection. *Front Microbiol.* 3,108, 1-20
- ⁵ Brown Gordon D, Denning David W., Neil A. R., Levitz Stuart M (2012) Hidden Killers: Human Fungal Infections *Sci Transl Med* 19;4;165-13
- ⁶ Denning D.W., Hope W.W., (2010) Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities., *Trends Microbiol.* 18(5)195-204.
- ⁷ Sifuentes-Osornio J., Corzo-León D.E, Ponce-de-León L.A., (2012) Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America, *Curr Fungal Infect Rep* 6(1)23–34
- ⁸ Martins N, Ferreira I.C., Barros L., Silva S, Henriques M., (2014) Candidiasis : Predisposing Factors , Prevention , Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia*, 177(5-6)223-40.
- ⁹ Yapar, N., (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis., *Ther Clin Risk Manag.* 13;10;95-105
- ¹¹ Mayer, F.L., Wilson, D., Hube, B., (2013) Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 15;4(2):119-28
- ¹² Gauwerky, K., Borelli, C., Korting, H.C., (2009) Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug Discov Today*, 14(3)214–222.
- ¹³ Morrell M., Fraser V.J., Kollef M.H. (2005) Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(9)3640–5
- ¹⁴ Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S., Moss M. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000., *N Engl J Med*, 348(16)1546-54.
- ¹⁵ Roemer T., Krysan D. J., (2014) Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 4(5)
- ¹⁶ Denning, D.W., Hope, W.W. (2010) Therapy for fungal diseases: Opportunities and priorities. *Trends Microbiol.* 18(5)195-204.
- ¹⁷ Mathew, B.P.,Nath, M., (2009) Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem*, 4(3)310–323.
- ¹⁸ Ghannoum M., Rice L. B. (1999) Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(4)501–17.
- ¹⁹ Maertens, J.A., Boogaerts, M.A. (2000) Fungal cell wall inhibitors: Emphasis on clinical aspects. *Curr Pharm Des.* 6(2)225–239.
- ²⁰ Georgopapadakou N. (2001). Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on β -1, 3-glucan synthase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs.* 10(2),269–280.
- ²¹ Lass-Flörl C. (2011) Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs*, 71(18)2405–19.
- ²² Kathiravan M.K., Salake A.B., Chothe A.S., Dudhe P.B. (2012) The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(19),5678–5698.

-
- ²³ Odds F.C., Brown A.J.P., Gow N.A. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11(6):272-279.
- ²⁴ Denning, D.W. (2003) Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*, 362(9390):1142-51.
- ²⁵ Ramakrishnan J., Rathore S. S., Raman T., (2016) Review on Fungal enzyme inhibitors- Potential drug targets to manage human fungal infections. *RSC Adv.*, (6)42387–42401.
- ²⁶ Perlin, D.S. (2007). Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat*, 10(3)121–130.
- ²⁷ Walker, L.A., Gow, N.A., Munro, C.A. (2010) Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol.* 47(2)117–126.
- ²⁸ Vicente M.F., Basilio A., Cabello A., Peláez F. (2003) Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect.* 9(1):15-32.
- ²⁹ Martins I.M., Cortés J.C., Muñoz J., Moreno M.B. i in. (2011). Differential activities of three families of specific $\beta(1,3)$ glucan synthase inhibitors in wild-type and resistant strains of fission yeast. *J Biol Chem.* 286(5)3484–3496.
- ³⁰ Lóránd T., Kocsis B. (2007). Recent advances in antifungal agents. *Mini Rev Med Chem.* 7(9):900-11.
- ³¹ Endo A., Kakiki K., Misato T. (1970) Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D. *J Bacteriol.* 104(1):189-96.
- ³² Szilágyi J., Földi R., Bayegan S., Kardos G., Majoros L. (2012) Effect of nikkomycin Z and 50% human serum on the killing activity of high-concentration caspofungin against *Candida* species using time-kill methodology *J Chemother.* 24(1):18-25.
- ³³ Milewski S., Mignini F., Borowski E. (1991) Synergistic action of nikkomycin X/Z with azole antifungals on *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 137(9):2155-61.
- ³⁴ Supuran, C.T., (2015) How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *J Enzyme Inhib Med Chem.* 31(3):345-60
- ³⁵ Supuran, C.T. (2015) Carbonic anhydrases: from biomedical applications of the inhibitors and activators to biotechnological use for CO₂ capture. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 28(2):229-30.
- ³⁶ Supuran, C.T., (2008) Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov.* 7(2)168–181.
- ³⁷ Hall R.A., De Sordi L., Maccallum D.M., Topal H., (2010) CO₂ acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 18;6(11)
- ³⁸ Innocenti A., Hall R.A., Schlicker C., Scozzafava A., i in. (2009) Carbonic anhydrase inhibitors . Inhibition and homology modeling studies of the fungal β -carbonic anhydrase from *Candida albicans* with sulfonamides. *Bioorg Med Chem.* 17(13)4503–4509.
- ³⁹ Schüttelkopf A.W., Gros L., Blair D.E., Frearson J.A., i in. (2010). Acetazolamide-based fungal chitinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 18(23):8334-40
- ⁴⁰ Bozdog M., Carta F., Vullo D., Isik S. (2015) Dithiocarbamates with potent inhibitory activity against the *Saccharomyces cerevisiae* β -carbonic anhydrase *J Enzyme Inhib Med Chem.* 31(1):132-6
- ⁴¹ Jastrzębowska K., Gabriel I., (2015) Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. *Amino Acids*, 47(2)227–249.
- ⁴² Alcazar-Fuoli L., (2016) Amino acid biosynthetic pathways as antifungal targets for fungal infections. *Virulence*, 7(4)376–378.
- ⁴³ Yamaki H., Yamaguchi M., Imamura H., Suzuki H., I in. (1990) The mechanism of antifungal action of (S)-2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoic acid, RI-331: the inhibition of homoserine dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 168(2):837-43.

⁴⁴ Yamaguchi H., Uchida K., Hiratani T., Nagate T., et al (1988) RI-331, a new anti- fungal antibiotic. *Ann N Y Acad Sci.* 544:188-90.

⁴⁵ De Pascale G., Nazi I., Harrison P.H., Wright G.D., (2011) β -Lactone natural products and derivatives inactivate homoserine transacetylase, a target for antimicrobial agents. *J Antibiot (Tokyo).* 64(7):483-7

⁴⁶ Aoki Y., Yamamoto M., Hosseini-Mazinani S.M., Koshikawa N., et al (1996) Antifungal azoxybacilin exhibits activity by inhibiting gene expression of sulfite reductase. *Antimicrob Agents Chemother* 40:127–132

⁴⁷ Nazi I., Scott A., Sham A., Rossi L. et al. (2007) Role of homoserine transacetylase as a new target for antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.*, 51(5)1731–1736.

⁴⁸ Duggleby R., Pang S., Yu H., Guddat L.W. (2003) Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. Interpretation of herbicide-resistance data. *Eur J Biochem* 270:2895–2904

⁴⁹ Lee Y.T., Cui C.J., Chow E.W., Pue N. et al. (2013) Sulfonylureas have antifungal activity and are potent inhibitors of *Candida albicans* acetohydroxyacid synthase. *J Med Chem* 56:210–219

⁵⁰ Durand P., Golinelli-Pimpaneau B., Mouilleron S., Badet B., et al., (2008) Highlights of glucosamine-6-P synthase catalysis. *Arch Biochem Biophys.* 474(2)302–17.

⁵¹ Badet B., Vermoote P., Le Goffic F. (1988) Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by N³-fumaroyl-L-2,3-diaminopropionic derivatives. *Biochemistry.* 27(7):2282-7

⁵² Teplyakov A., Obmolova G., Badet-Denisot M.A., Badet B., et al. (1998) Involvement of the C terminus in intramolecular nitrogen channeling in glucosamine 6-phosphate synthase: evidence from a 1.6 Å crystal structure of the isomerase domain. *Structure.* 6(8):1047-55.

⁵³ Miszkiel A., Wojciechowski M., Milewski S. (2011) Long range molecular dynamics study of regulation of eukaryotic glucosamine-6-phosphate synthase activity by UDP-GlcNAc. *J Mol Model.* 17(12):3103-15

⁵⁴ Teplyakov, a et al., 2001. Channeling of ammonia in glucosamine-6-phosphate synthase. *J Mol Model.* 313(5), pp.1093–1102.

⁵⁵ Walker B., Brown M.F., Lynas J.F., Martin S.L., et al., (2000) Inhibition of *Escherichia coli* glucosamine synthetase by novel electrophilic analogues of glutamine--comparison with 6-diazo-5-oxonorleucine. *Bioorg Med Chem Lett.* 10(24):2795-8.

⁵⁶ Wojciechowski M., Milewski S., Mazerski J., Borowski E. (2005) Glucosamine-6-phosphate synthase, a novel target for antifungal agents. Molecular modelling studies in drug design. *Acta Biochim Pol.* 52(3):647-53.

⁵⁷ Walker B., Brown M. F., Lynas J.F., Martin S.L. et al. (2000) Inhibition of *Escherichia coli* glucosamine synthetase by novel electrophilic analogues of glutamine--comparison with 6-diazo-5-oxonorleucine. *Bioorg Med Chem Lett.* 10(24):2795-8.

⁵⁸ Milewski S, Chmara H, Borowski E. (1986) Anticapsin: an active site directed inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthetase from *Candida albicans*. *Drugs Exp Clin Res.* 12(6-7):577-83.

⁵⁹ Massière F., Badet-Denisot M. A., René L., Badet B. (1997) Design, Synthesis, and Evaluation of the First Mechanism-Based Inhibitor of Glucosamine 6-Phosphate Synthase, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (24)5748–5749

⁶⁰ Chmara H., Borowski E. (1973) Antibiotic tetaïne, a new inhibitor of murein precursor synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52(4):1381-7.

⁶¹ Woynarowska B., Witkowski A., Borowski E., Differential inhibition of DNA and RNA biosynthesis in HeLa S3 cells by tetaïne, a dipeptide antibiotic. *Biochim. Biophys. Acta*, 825, 199-206, 1985.

⁶² Bearne S.L., Blouin, C., (2000) Inhibition of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase by reactive intermediate analogues. The role of the 2-amino function in catalysis. *Biochemistry*, 275(1)135–140.

⁶³ Camus C. L., Badet-Denisot M. A., Badet B. (1998) Arabinose-5-Phosphate Oxime vs its Methylene phosphonate Mimetic as High Energy Intermediate of the Glucosamine-6P Synthase Catalyzed Reaction. *Tetrahedron Lett* 39, 2571–2572

⁶⁴ Janiak A. M., Hoffmann M., Milewska M. J., Milewski S. (2003) 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.*, 11(8):1653-62.

⁶⁵ Molloy B. B., Lively D. H., Gale R. M., Gorman M. (1972) A new dipeptide antibiotic from *Streptomyces collinus*, Lindenbein. *J Antibiot (Tokyo)*. 25(2):137-40.

⁶⁶ Milewski S., (2002) Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 1597(2):173-92.

⁶⁷ Milewski S., Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E. (1985) Synthetic derivatives of N³-fumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic acid inactivate glucosamine synthetase from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*. 828(3):247-54.

⁶⁸ Andruszkiewicz R., Jedrzejczak R., Zieniawa T., Wojciechowski M., Borowski E., (2000) N³-oxoacyl derivatives of L-2,3-diaminopropanoic acid and their peptides; novel inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase., *J Enzyme Inhib*. 15(5):429-41.

⁶⁹ Andruszkiewicz R., Zieniawa T., Chmara H., Kasprzak L., Borowski E. (1994) Synthesis and anticandidal activities of optimized analogs of antibiotic Sch 37137., *J Antibiot (Tokyo)*. 47(6):715-23

⁷⁰ Milewski S., Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E., (1992) N³-haloacetyl derivatives of L-2,3-diaminopropanoic acid: novel inactivators of glucosamine-6-phosphate synthase, *Biochim Biophys Acta*. 1115(3):225-9.

⁷¹ Andruszkiewicz R., Chmara H., Milewski S., Borowski E. (1987) Synthesis and biological properties of N³-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid dipeptides, a novel group of antimicrobial agents., *J Med Chem*. 30(10):1715-9.

⁷² Milewski S., Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E. et al. (1988) Antifungal peptides with novel specific inhibitors of glucosamine 6-phosphate synthase., *Drugs Exp Clin Res*. 14(7):461-5

⁷³ Smith R.J., Milewski S., Brown A.J., Gooday G.W. (1996) Isolation and characterization of the GFA1 gene encoding the glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase of *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 178(8):2320-7.

⁷⁴ Andruszkiewicz R., Zieniawa T., Walkowiak A. (2005) Anticandidal properties of N-acylpeptides containing an inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthase, *J Enzyme Inhib Med Chem*. 20(2):115-21.

⁷⁶ Zgódka D., Jedrzejczak R., Milewski S., Borowski E. (2001) Amide and ester derivatives of N³-(4-methoxyfumaroyl)-(S)-2,3-diaminopropanoic acid: the selective inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthase., *Bioorg Med Chem*. 9(4):931-8.

⁷⁷ Koszel D., Łącka I., Kozłowska-Tylingo K., Andruszkiewicz R. (2012) The synthesis and biological activity of lipophilic derivatives of bicine conjugated with N³-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid (FM DP)-an inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthase., *J Enzyme Inhib Med Chem*. 27(2):167-73

⁷⁸ Clayton J.P., Cole M., Elson S.W., Ferres H. et al. (1976) Preparation, hydrolysis, and oral absorption of lactonyl esters of penicillins., *J Med Chem*. 19(12):1385-91.

⁷⁹ Andruszkiewicz R., Chmara H., Milewski S., Borowski E., (1986) Synthesis of N³-fumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic acid analogues, the irreversible inhibitors of glucosamine synthetase. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 27, 449-453,

⁸⁰ Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan, F.M. (1962) The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 1839-1842,

⁸² Jakubke H., Jeschkeit H., (1989) Aminokwasy, peptydy, białka., Wyd. PWN, 141-142.

⁸³ Walkowiak A., Wakieć R., Bontemps-Gracz M., Andruszkiewicz R. (2005) Glutamine analogues containing a keto function--novel inhibitors of fungal glucosamine-6-phosphate synthase. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 20(5):439-47.

⁸⁴ Kobayashi Y.; Nakano M., Kumar G. B., Kishihara K. (1998) Efficient conditions for conversion of 2-substituted furans into 4-oxygenated 2-enoic acids and its application to synthesis of (+)-aspicilin, (+)-patulolide A, and (-)-pyrenophorin, *J Org Chem.* 63(21);7505-7515,

⁸⁵ Isupov, M. N., Obmolova G., Butterworth S., Badet-Denisot M.A. et al. (1996) Substrate binding is required for assembly of the active conformation of the catalytic site in Ntn amidotransferases: evidence from the 1.8 Å crystal structure of the glutaminase domain of glucosamine 6-phosphate synthase, *Structure* 63(21):7505-7515.

⁸⁶ Zgódko D., Milewski S., Borowski E. (2001) A diffusible analogue of N³-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid with antifungal activity., *Microbiology.* 2001 147(Pt 7):1955-9.

⁸⁷ Wang S.S., Gisin B.F., Winter D.P., Makofske R. (1977) Facile Synthesis of Amino Acid and Peptide Esters, under Mild Conditions via Cesium Salts, *J. Org. Chem.* 42(8):1286-90

⁸⁸ J.Otera, Esterification: Methods, Reactions and Applications - Wiley VCH -2004

⁸⁹ Koszel D.,

⁹⁰ Ono N., Yamada T., Saito T., Tanaka K. et al. (1978) A convenient procedure for esterification of carboxylic acids. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 51, 2401-2404,

⁹¹ Daryae F1, Kobarfard F, Khalaj A, Farnia P. (2009) Synthesis and evaluation of in vitro anti-tuberculosis activity of N-substituted glycolamides. *Eur J Med Chem.* 44(1):289-95

⁹² Houston T. A., Wilkinson B. L., Blanchfield J. T. (2004) Boric Acid Catalyzed Chemoselective Esterification of α -Hydroxycarboxylic Acids, *Org.Lett.*, 6(5):679-81.

⁹³ Patent; Eli Lilly and Company; US5250542; (1993); (A1) English

⁹⁴ Prakash T. P., Kawasaki A. M., Wancewicz E. V, Shen L. (2008). Comparing In Vitro and In Vivo Activity of 2'-O-[2-(Methylamino)-2-oxoethyl]- and 2'-O-Methoxyethyl-Modified Antisense Oligonucleotides, *J Med Chem.* 1(9):2766-76

⁹⁵ Gallot, E. A., Geuman, S. H. (1993). Hydrogen-Bond-Mediated Folding in Depsipeptide Models of α -Turns and β -Helical Turns, *J.Am.Chem. Soc.* 115(21)9774–9788.

⁹⁶ Cheng J., Teplý B.A., Sherifi I., Sung J., et al. (2007) Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials.* 28(5):869-76

⁹⁷ Johnstone T.C., Lippard S.J. (2013) The Effect of Ligand Lipophilicity on the Nanoparticle Encapsulation of Pt(IV) Prodrugs. *Inorg. Chem.* 52(17):9915-20.

⁹⁸ I. Soares- D. Entian, M. Casal, The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1 from *Candida albicans* impairs the transport of lactate., *Molecular Membrane Biology.* 21 (2004) 403-11.

⁹⁹ Casal, M, Paiva, S Andrade, R P The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *Journal of Bacteriology.* 181 (1999) 2620-3.

¹⁰⁰ Fisher C., Ratchford, William P., (1949) Preparation of N-substituted lactamides by aminolysis of methyl lactate, *J. Org. Chem.* 15 (2), pp 317–325

¹⁰¹ Czarnecka J., Kwiatkowska K, Gabriel I., Wojciechowski M. et al. (2012) Engineering *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase for efficient enzyme purification. *J Mol Recognit.* ;25(11):564-70.

¹⁰² Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.1, Accelrys Software Inc, San Diego, 2012.

¹⁰³ Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., et al. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30(16):2785-91

¹⁰⁴ Suggs J.W., Pires R.M. (1997) Facile hydrolysis and formation of amide bonds by N-hydroxyethylation of α -amino acids. *Tetrahedron Lett.*, 38, 2227-2230,

¹⁰⁵ Milewski S., Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E. (1985) Synthetic derivatives of N³-fumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic acid inactivate glucosamine synthetase from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 828, 247-254----juz jest

¹⁰⁶ Organic synthesis - 80 Vol Collection – Gilman 109