



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Kornelia Skarbek

Dyscyplina naukowa: chemia

ROZPRAWA DOKTORSKA

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

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Chemical modification of Amphotericin B and Nystatin A₁.

Promotor

podpis

prof. dr hab. inż. Maria J. Milewska

Podziękowania

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

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

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

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

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

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

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	11
Streszczenie	13
Część literaturowa	15
1. Wstęp.....	15
2. Makrolidy polienowe	18
2.1. Struktura chemiczna makrolidów polienowych	18
2.1.1. Struktura chemiczna amfoterycyny B.....	20
2.1.2. Struktura chemiczna nystatyn	21
2.2. Mechanizm działania przeciwgrzybowego makrolidów polienowych.....	22
2.3. Oporność mikroorganizmów na leki polienowe.....	24
3. Chemiczne modyfikacje makrolidów polienowych.....	26
3.1. Modyfikacje makrolidów polienowych na grupie aminowej jednostki cukrowej.	26
3.1.1. <i>N</i> -acyłowe pochodne makrolidów polienowych.....	26
3.1.2. <i>N</i> -alkilowe pochodne makrolidów polienowych	28
3.1.3. <i>N</i> -glikozyłowe pochodne makrolidów polienowych	30
3.2. Modyfikacje makrolidów polienowych na grupie karboksylowej	33
3.2.1. Estry makrolidów polienowych	33
3.2.2. Amidy, hydrazydy oraz pochodne mocznikowe makrolidów polienowych.....	34
3.3. Modyfikacje aglikonu makrolidów polienowych.....	35
3.3.1. Modyfikacje struktury makrolidów polienowych na atomach węgla C13 oraz C14.....	35
3.3.2. Modyfikacje syntetyczne na atomie węgla C16 amfoterycyny B - redukcja grupy karboksylowej.....	38
3.3.3. Modyfikacje syntetyczne na atomie węgla C19 amfoterycyny B...40	
3.3.4. Modyfikacje na atomie węgla C'2 makrolidów polienowych.....	42
3.4. Inne pochodne makrolidów polienowych	43
4. Synteza <i>de novo</i> półsyntetycznych analogów amfoterycyny B	49
Cel i zakres pracy	50
Wyniki i dyskusja	51
1. Synteza aglikonów makrolidów polienowych.....	54



2. Próby otrzymywania półsyntetycznych analogów amfoterycyny B.....	60
2.1. Badania reakcji substytucji nukleofilowej z udziałem aglikonu AmB.....	60
2.2. Badanie reakcji dehydracyjnej glikozylacji.....	63
2.2.1. Synteza hemisyntetycznych amfoterycyn	63
2.3. Interpretacja widm korelacyjnych otrzymanych koniugatów AmB.....	66
3. Synteza pochodnych aminocukrowych.....	70
3.1. Przegląd literaturowy syntez pochodnych aminocukrów	70
3.1.1. Synteza aminocukrów z wykorzystaniem reakcji substytucji nukleofilowej (S_N2).....	70
3.1.2. Synteza aminocukrów z wykorzystaniem pochodnych epoksydowych.....	72
3.1.3. Addycja grup zawierających atom azotu do wiązania podwójnego glukali	73
3.1.3.1. Addycja jonu azydkowego do glukali	73
3.1.3.2. Fotoindukowane tworzenie pierścienia azyrydynowego w glukalach.....	74
3.1.3.3. Asymetryczna aminohydroksylacja glukali	75
3.1.4. Addycja jonu cyjankowego do grupy karbonylowej cukru.....	75
3.1.5. Synteza totalna aminocukrów	76
3.1.5.1. Synteza <i>de novo</i> aminocukrów z alkoholi.....	76
3.1.5.2. Synteza <i>de novo</i> aminocukrów z wykorzystaniem kwasów, estrów lub laktonów jako substratów	78
3.2. Synteza pochodnych cukrowych.....	80
3.2.1. Synteza 3-azydo-3-deoksycukrów	80
3.2.1.1. Synteza 3-azydo-2,3,5-trideoksykilozy	80
3.2.1.2. Synteza 3-azydo-3-deoksyheksoz	82
3.2.2. Synteza pochodnych glukozy	87
3.2.3. Synteza i właściwości 2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukozaminy oraz analogów 6-sulfo-D-glukitolu.....	88
4. Synteza koniugatów makrolidów polienowych z nanonośnikami	92
4.1. Wyniki badań biologicznych	95
5. Podsumowanie i wnioski końcowe.....	99
Część eksperymentalna	102
1. Aparatura.....	102

2. Synteza chronionych aglikonów makrolidów polienowych	103
2.1. <i>N</i> -(9-Fluorenylmetoksykarbonylo)-makrolid polienowy – procedura ogólna	103
<i>N</i> -(9-Fluorenylmetoksykarbonylo)-nystatyna A ₁ (1)	103
<i>N</i> -(9-Fluorenylmetoksykarbonylo)-amfoterycyna B (4).....	104
2.2. Ketal metylowy makrolidu polienowego – procedura ogólna	104
Ketal metylowy nystatyny A ₁ (2).....	105
Ketal metylowy amfoterycyny B (5)	105
2.3. Eter nonatrietylosililowy makrolidu polienowego – procedura ogólna	105
Eter nonatrietylosililowy nystatyny A ₁ (3).....	106
Eter nonatrietylosililowy amfoterycyny B (6a)	106
2.4. Ester allilowy <i>N</i> -Fmoc-nona- <i>O</i> -trietylosilylo- <i>O</i> -metylo-amfoterycyny B (7)	107
2.5. Chroniony heptaenon (8).....	108
2.6. Chroniony aglikon amfoterycyny B (9).....	109
3. Synteza niecukrowych pochodnych	109
3.1. <i>N</i> - <i>tert</i> -butoksykarbonylo-4-fluoroanilina (13)	109
3.2. 3-[(<i>N</i> - <i>tert</i> -butoksykarbonylo)amino]-1-propanol (14).....	110
3.3. Metanosulfonian 3-[(<i>N</i> - <i>tert</i> -butoksykarbonylo)amino]-1-propylu (16).	110
4. Synteza pochodnej 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksylozy	111
4.1. <i>O</i> -metylo-2-deoksy-D-ryboza (27).....	111
4.2. <i>O</i> -metylo-2,5-dideoksy-5-jodo-D-ryboza (28).....	111
4.3. <i>O</i> -metylo-2,3,5-trideoksy-D-ryboza (29).....	112
4.4. <i>O</i> -metylo-3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksyloza (31).....	112
4.5. 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksyloza (19).....	113
5. Synteza pochodnych 3-azydo-3-deoksy-D-heksoz	113
5.1. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno- α -D-glukofuranoza (33)	113
5.2. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3-okso- α -D-glukofuranoza (40)	114
5.3. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno- α -D-allofuranoza (41).....	114
5.4. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3- <i>O</i> -trifluorometanosulfonylo- α -D-furanoza – procedura ogólna.....	114
1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3- <i>O</i> -trifluorometanosulfonylo- α -D-gluko- furanoza (34).....	115
1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3- <i>O</i> -trifluorometanosulfonylo- α -D- allofuranoza (42).....	115



5.5. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-allofuranoza (34a) ...	115
5.6. 1,2;5,6-di- <i>O</i> -izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-glukofuranoza (43) ..	116
5.7. 3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd allilu – procedura ogólna	117
3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd allilu (36)	117
3-azydo-3-deoksy- α -D-glukopiranozyd allilu	117
5.8. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd allilu – procedura ogólna.....	118
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd allilu (37)	118
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd allilu..	119
2,4,6-tri- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butylodimetylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd allilu	119
5.9. 3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd 4-pentenylu – procedura ogólna	119
3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (38)	120
3-azydo-3-deoksy- α -D-glukopiranozyd 4-pentenylu (44).....	120
5.10. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd 4-pentenylu – procedura ogólna	121
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39)	121
2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd 4-pentenylu (45)	121
5.11. 2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranoza – procedura ogólna.....	122
2,4,6-tri- <i>O</i> -(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranoza (20).....	122
2,4,6-tri- <i>O</i> -trietylosililo-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranoza (21)	122
6. Synteza pochodnych glukozy.....	123
6.1. 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acetylo-D-glukopiranoza.....	123
6.2. 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetylo-D-glukopiranoza (17)	123
6.3. 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetylo-1-bromo-D-glukopiranoza (12)	123
6.4. 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzylu-D-glukopiranoza (18)	124
6.5. 2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozyd benzylu (48).....	124
6.6. 2-acetamido-6-bromo-2,6-dideoksy-D-glukopiranozyd benzylu (49)	125
6.7. 2-acetamido-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozyd benzylu (50).....	125
6.8. 2-amino-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranoza (51a).....	126

6.9. 2-acetamido-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranoza (52a)	127
6.10. Ester metylowy 2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy – przepis ogólny...	127
Ester metylowy 2-amino-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy (51b)	127
Ester metylowy 2-acetamido-2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy (52b)	128
6.11. Kwas 2-deoksy-D-glukitol-6-sulfonowy – procedura ogólna.....	128
Kwas 2-amino-2-deoksy-D-glukitol-6-sulfonowy (53)	128
Kwas <i>N</i> -acetylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitol-6-sulfonowy (54)	128
7. Łączenie chronionego aglikonu AmB z cząsteczkami cukrów –procedura ogólna	129
7.1. Aglikon AmB połączony z 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksylozą (22).....	129
7.2. Aglikon AmB połączony z 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzylo-D-glukopiranozą (23)...	130
8. Tworzenie koniugatów makrolidów polienowych z 'parasolami molekularnymi'	130
8.1. Ester aktywny TDBTU makrolidu polienowego – procedura ogólna	130
<i>O</i> -(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)- <i>N</i> -Fmoc-amfoterycyna B (61)	130
<i>O</i> -(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)- <i>N</i> -Fmoc-nystatyna A ₁ (62)	131
8.2. Koniugaty typu dwuścienny parasol molekularny/ ω -aminokwas/makrolid polienowy – procedura ogólna	131
<i>N</i> ³ -(<i>N</i> -amfoterycynoilo-3-aminopropanoilo)- <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁷ -di-deoksycholoilo-spermidyna (63)	131
<i>N</i> ³ -(<i>N</i> -amfoterycynoilo-4-aminobutanoilo)- <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁷ -di-deoksycholoilo-spermidyna (64)	132
<i>N</i> ³ -(<i>N</i> -amfoterycynoilo-6-aminoheksanoilo)- <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁷ -di-deoksycholoilo-spermidyna (65)	132
<i>N</i> ³ -(<i>N</i> -amfoterycynoilo-8-aminooktanoilo)- <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁷ -di-deoksycholoilo-spermidyna (66)	132
<i>N</i> ³ -(<i>N</i> -nystatynoilo-3-aminopropanoilo)- <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁷ -di-deoksycholoilo-spermidyna (67)	133
<i>N</i> ³ -(<i>N</i> -nystatynoilo-4-aminobutanoilo)- <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁷ -di-deoksycholoilo-spermidyna (68)	133
<i>N</i> ³ -(<i>N</i> -nystatynoilo-6-aminoheksanoilo)- <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁷ -di-deoksycholoilo-spermidyna (69)	133
<i>N</i> ³ -(<i>N</i> -nystatynoilo-8-aminooktanoilo)- <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁷ -di-deoksycholoilo-spermidyna (70)	134



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

Wykaz stosowanych skrótów

AIBN	azobis(izobutyronitryl)
AmB	amfoterycyna B, nazwa systematyczna: kwas (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,12 <i>E</i> ,14 <i>E</i> ,16 <i>E</i> ,18 <i>S</i> ,19 <i>R</i> ,20 <i>R</i> ,21 <i>S</i> ,25 <i>R</i> ,27 <i>R</i> , 30 <i>R</i> ,31 <i>R</i> ,33 <i>S</i> ,35 <i>R</i> ,37 <i>S</i> ,38 <i>R</i>)-3-[(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4-amino-3,5- dihydroksylo-6-metyloksan-2-yl]oksy-19,25,27,30,31,33,35,37- oktahydroksylo-18,20,21-trimetylo-23-okso-22,39- dioksabicyklo[33.3.1]nonatriakonta-4,6,8,10,12,14,16-heptaeno- 38-karboksylowy
Ar	grupa arylowa
Bn	grupa benzylowa
BnOH	alkohol benzylowy
Boc	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
CD₃OD	tetra-deuterometanol
CDI	<i>N,N'</i> -karbonylodiimidazol
CSA	kwas kamforosulfonowy
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinon
DIAD	azodikarboksylan diizopropylu
DIBALH	wodorek diizobutyloglinu
DIPEA	diizopropylodetyloamina
DMA	<i>N,N</i> -dimetyloacetamid
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
dmgH	monoanion dimetyloglioksyny
DMSO	dimetylosulfotlenek
DPPA	azydek difenylofosforanowy (<i>ang.</i> diphenyl phosphoryl azide)
ESI-MS	spektrometria mas z jonizacją z użyciem elektrorozpylania (<i>ang.</i> electrospray ionisation mass spectrometry)
Et	grupa etylowa
Fmoc	grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
HMBC	<i>ang.</i> heteronuclear multiple bond coherence
HOBt	1-hydroksybenzotriazol
HSQC	<i>ang.</i> heteronuclear single quantum correlation
Imd	grupa imidazolosulfonowa
LC	chromatografia cieczowa (<i>ang.</i> liquid chromatography)
mCPBA	kwas <i>m</i> -chloroperoksybenzoesowy
MP	grupa <i>p</i> -metoksyfenylowa
mPEG	glikol metoksypolietylenowy
Ms	grupa mesylowa



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

Streszczenie

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

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

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



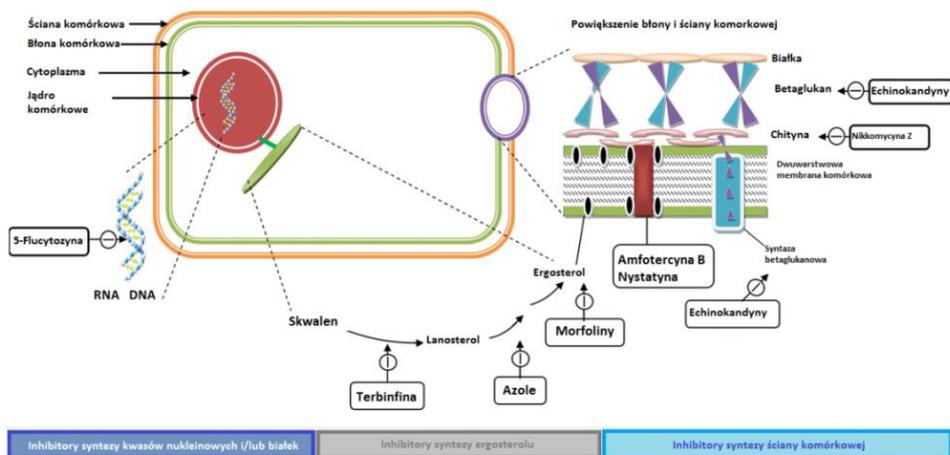
Część literaturowa

1. Wstęp

Królestwo grzybów obejmuje ogromną różnorodność grup taksonomicznych należących do różnych nisz ekologicznych, mających inną strategię cyklu życiowego, a także morfologię. Jednak niewiele jeszcze wiadomo o ich prawdziwej bioróżnorodności. Szacuje się, że aż 1,5 milionów gatunków należy do tego królestwa, a tylko około 5% zostało oficjalnie sklasyfikowanych. Wiele z nich powoduje infekcje zwane grzybicami. Na początku XX wieku epidemie bakteryjne były główną przyczyną licznych zgonów na całym świecie, w przeciwieństwie do zakażeń grzybiczych, które były praktycznie pomijane. Dopiero od lat 70-tych ubiegłego wieku, w warunkach szerokiego stosowania chemoterapii przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej oraz leków immunosupresyjnych, nastąpił drastyczny wzrost częstotliwości występowania grzybic układowych i obecnie to one stanowią jedno z ważniejszych zagrożeń dla zdrowia, a nawet życia ludzi.¹ Reakcje organizmu w zetknięciu z patogenami grzybowymi możemy podzielić na: reakcje alergiczne na białka grzybicze, reakcje na toksyny występujące w niektórych grzybach oraz infekcje, czyli grzybice.² Tylko niektóre gatunki grzybów powodują choroby u zdrowych osób, większość z nich staje się patogenna tylko wtedy, gdy gospodarz ma osłabioną odporność.³ W związku z tym zwiększoną częstotliwość występowania infekcji grzybiczej obserwuje się u osób z niedoborem odporności, np. typu AIDS, pacjentów onkologicznych i diabetyków, pacjentów po przeszczepach narządów, i innych inwazyjnych zabiegach chirurgicznych. Zdrowe osoby są natomiast podatne na powierzchniowe, skórne oraz podskórne zakażenia, w rzadkich przypadkach dochodzi do infekcji układowych. Wiele zakażeń jest spowodowanych przez patogeny oportunistyczne, które mogą pochodzić, zarówno ze środowiska (zakażenie *Cryptococcus*), jak i być endogenne (zakażenie *Candida*). Pomimo szeroko zakrojonych badań, które poświęcone są opracowaniu nowych strategii terapeutycznych, dostępna jest obecnie tylko niewielka liczba leków zwalczających zakażenia grzybicze. Główne grupy leków przeciwgrzybiczych i miejsca ich działania przedstawiono na **Rysunku 1**.^{2,4} W rzeczywistości, w praktyce klinicznej, w leczeniu układowych infekcji grzybiczych, używa się obecnie jedynie czterech klas tych leków. Należą do nich: 5-fluorocytozyna, antybiotyki z grupy makrolidów polienowych, leki syntetyczne z grupy pochodnych triazolu i echinokandyny. Ponadto niektóre z nich mają bardzo wąski zakres zastosowania. Flucytozyna ingeruje w syntezę



DNA, ma wąskie spektrum działania i indukuje szybkie narastanie specyficznej oporności drobnoustrojów grzybowych.⁵ Pochodnie triazoli, takie jak Flukonazol i Vorikonazol, zakłócają biosyntezę ergosterolu poprzez hamowanie aktywności enzymu demetylazy lanosterolowej i mają działanie grzybostatyczne oraz indukują powstawanie oporności specyficznej i wielolekowej. Wykazano także, że leki te oddziałują z dużą ilością innych farmaceutyków stąd ich zastosowanie ogranicza się tylko do określonych przypadków.⁵ Spektrum przeciwgrzybowe echinokandyn będących inhibitorami syntazy $\beta(1\rightarrow3)$ glukanu, jest stosunkowo wąskie. Kilka innych klas antymykotyków, takich jak morfoliny i alliloaminy, wykorzystywanych jest jako leki działające miejscowo, do leczenia grzybic powierzchniowych, ze względu na niską skuteczność bądź też poważne, niepożądane skutki uboczne. Najskuteczniejsze w leczeniu grzybic układowych antybiotyki z grupy makrolidów polienowych, w tym szczególnie Amfoterycyna B, zawdzięczają swoją skuteczność zdolności do bezpośredniej interakcji z ergosterolem – głównym składnikiem błony komórkowej komórki grzybowej. Odpowiada on za płynność, asymetrię oraz integralność błony.⁶



Rysunek 1. Schemat działania leków przeciwgrzybiczych.²

Kontrola systemów eukariotycznych stanowi jeden z najtrudniejszych problemów w chemioterapii. Jednym spośród wciąż nierozwiązanych potrzeb klinicznych jest chemioterapia układowych zakażeń grzybiczych. Ogólnoustrojowa kandydoza, aspergiloza, histoplazmoza i kryptokokoza stanowią w dalszym ciągu poważny i rosnący problem.⁷ W ostatnich latach pojawiło się nowe zagrożenie ze względu na występowanie szczepów grzybów o oporności wielolekowej. Idealny środek przeciwgrzybiczy powinien



wykazywać wysoką aktywność, posiadać szerokie spektrum działania oraz być silnie grzybobójczy. Nie powinien indukować oporności, mając jednocześnie zdolność do przewycięzania oporności wielolekowej, a ponadto musi charakteryzować się niską toksycznością dla ludzi. Żaden z dostępnych klinicznie leków przeciwgrzybiczych nie spełnia wszystkich tych wymagań. Dlatego też trwają prace badawcze nad nowatorskimi lekami, które opierają się na dwóch strategiach. Pierwszą z nich jest poszukiwanie nowego celu, na który działałby wysoce selektywnie potencjalny lek, drugą natomiast jest chemiczna modyfikacja istniejących już leków. Najbardziej atrakcyjne w drugiej strategii wydają się być antybiotyki z grupy makrolidów polienowych. Posiadają one następujące zalety: wykazują wysoką aktywność grzybobójczą oraz szeroki jej zakres, a ponadto wrodzona lub nabyta odporność na te leki jest bardzo niska. Niestety mają też poważną wadę, ponieważ antybiotyki z tej grupy posiadają niższe (ale nie znikome) powinowactwo do cholesterolu, który jest ludzkim odpowiednikiem grzybowego ergosterolu. Powinowactwo to wyjaśnia dużą toksyczność oraz występowanie wielu efektów ubocznych podczas stosowania polienów jako leków przeciwgrzybiczych.^{7,8}

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

2. Makrolidy polienowe

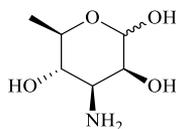
Makrolidy polienowe były pierwszymi lekami zastosowanymi w terapii przeciwgrzybiczej. Odkrycie amfoterycyny B i nystatyny A₁ w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku dostarczyło nowych możliwości terapeutycznych.^{9,10} W następnych latach odkryto ponad 200 kolejnych makrolidów polienowych posiadających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

2.1. Struktura chemiczna makrolidów polienowych

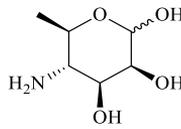
Do poznania skomplikowanych struktur chemicznych złożonych makrolidów polienowych w znacznym stopniu przyczyniły się takie techniki, jak spektrometria mas oraz magnetyczny rezonans jądrowy.¹² Antybiotyki polienowe zbudowane są z dużych pierścieni laktonowych (20 – 44 członowych) zawierających od trzech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



4,6-dideoksy-D-mannoza) przy jednoczesnym braku w jej strukturze grupy karboksylowej, czy pentamycyna nie mająca, zarówno jednostki cukrowej, jak i grupy karboksylowej.^{12,14}



mykozamina



perozamina

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

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

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

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



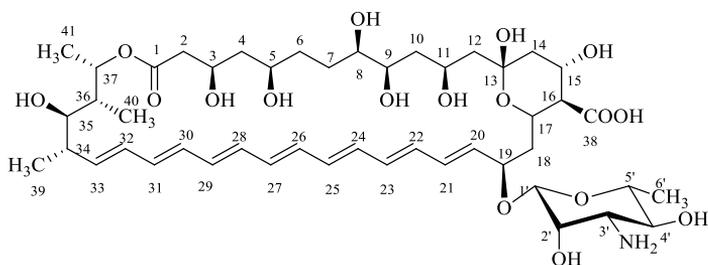
		<i>licheniformis</i> jest unikalna ze względu na obecność atomu fosforu w cząsteczce. ^{15,16}
Tetraeny	Pimarycyna	Jako jedyna spośród makrolidów polienowych ma w strukturze pierścieni epoksydowy łączący atomy węgla C4 i C5. Pimarycyna wykazuje aktywność biologiczną względem pleśni, drożdży i bakterii.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

2.1.1. Struktura chemiczna amfoterycyny B

Struktura chemiczna oraz stereochemia AmB zostały określone za pomocą metod rentgenowskiego badania monokryształów.¹⁹ Amfoterycyna B produkowana jest przez *Streptomyces nodosus* i pierwszy raz została wyizolowana w roku 1956 przez Stillera *et. al.*⁹ Należy do niearomatycznej podgrupy heptaenów, a jej masa molowa wynosi 923.49 g/mol. W 38-członowym pierścieniu laktonowym AmB występuje: 14 centrów stereogenicznych, siedem sprzężonych wiązań podwójnych, osiem grup hydroksylowych, jedna



karboksylowa, a do pierścienia laktonowego przyłączona jest cząsteczka aminocukru – mykozaminy²⁰ w konformacji krzesłowej. Mykozamina połączona jest z pierścieniem laktonowym poprzez atom węgla C19 wiązaniem β -glikozydowym (**Rysunek 3**). W pH obojętnym amfoterycyna B występuje w postaci jonu obojnaczonego (*ang.* zwitterion). Obecność pierścienia hemiketalowego w cząsteczce może tłumaczyć jej słabą rozpuszczalność, zarówno w wodzie, jak i w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych. Ze względu na swoją amfipatyczną naturę może oddziaływać na granicy faz woda – olej. Grupy hydroksylowe ulokowane z jednej strony cząsteczki tworzą część hydrofilową, natomiast układ sprzężonych wiązań podwójnych – część hydrofobową. Grupy karboksylowa wraz z aminową – znajdującą się we fragmencie cukrowym, tworzą polarną „głowę” makrolidu.^{1,12}



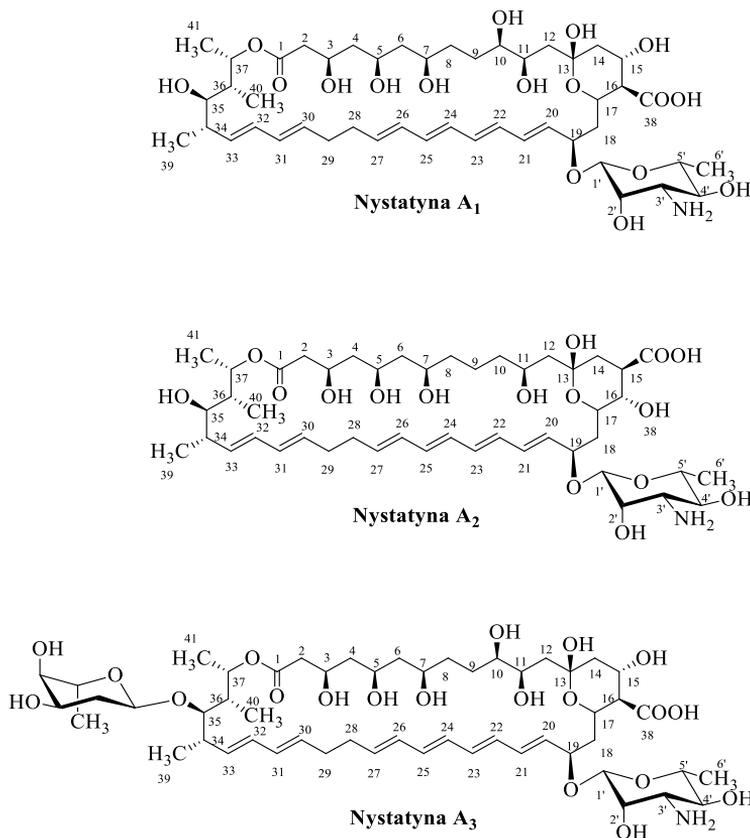
Rysunek 3. Struktura amfoterycyny B – przedstawiciela heptaenów.

2.1.2. Struktura chemiczna nystatyn

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



występują dwa sprzężone wiązania podwójne. Obecność wiązania pojedynczego w pierścieniu makrolaktonowym odpowiedzialna jest za jego labilność i umożliwia wewnątrzcząsteczkową translaktonizację prowadzącą do utworzenia cząsteczki izonystatyny A₁.²⁴ NYS A₂ ma bardzo podobną strukturę do A₁ różni się jedynie brakiem grupy hydroksylowej na atomie węgla C10, a grupa karboksylowa znajduje się na atomie węgla C15, a nie C16. Natomiast NYS A₃ posiada w swojej strukturze dodatkową cząsteczkę aminocukru L-digitoksozę związaną z atomem węgla C35 (**Rysunek 4**).^{19,22}



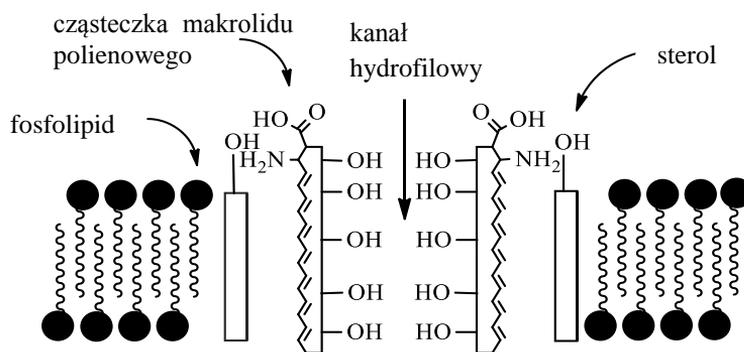
Rysunek 4. Struktury nystatyn należących do grupy tetraenów.

2.2. Mechanizm działania przeciwgrzybowego makrolidów polienowych

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



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



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

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



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

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

2.3. Oporność mikroorganizmów na leki polienowe

Wzrost zachorowalności na AIDS, postęp w dziedzinie technologii terapeutycznych (w tym także przeszczepów narządów), stosowanie agresywnych chemoterapii przeciwbakteryjnych oraz zintesyfikowane zastosowanie urządzeń wewnątrznaczyniowych w przeciągu ostatnich dekad doprowadziły



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

3. Chemiczne modyfikacje makrolidów polienowych

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

3.1. Modyfikacje makrolidów polienowych na grupie aminowej jednostki cukrowej

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

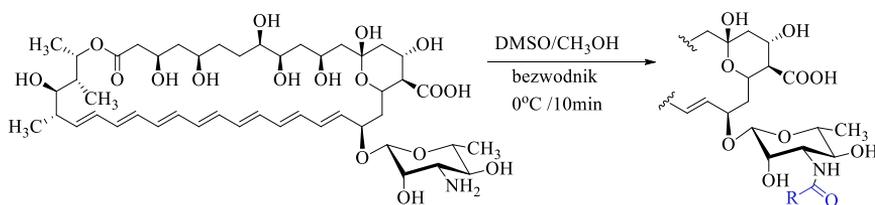
3.1.1. *N*-acylowe pochodne makrolidów polienowych

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

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



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



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

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

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

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



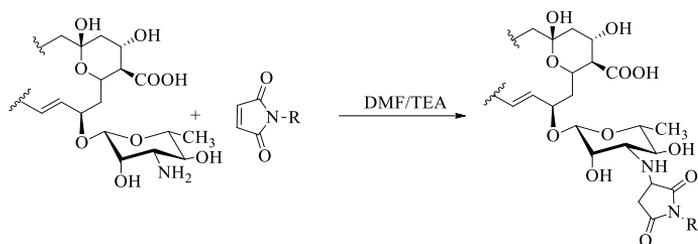
azydku difenylofosforanowego (DPPA). Wykorzystanie azydku skracало dwukrotnie czas syntezy, a otrzymane wydajności zbliżone były do metody z użyciem estru aktywnego.⁴⁸

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

3.1.2. *N*-alkilowe pochodne makrolidów polienowych

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

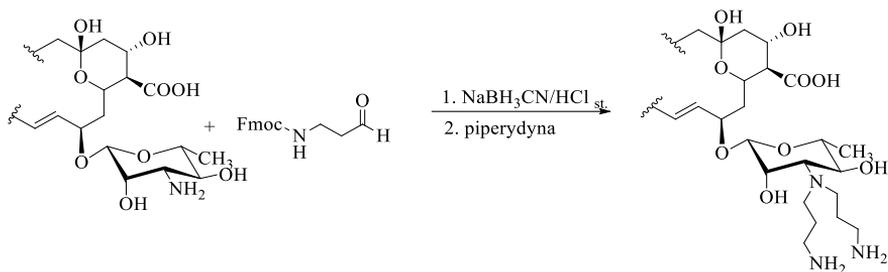
Czerwiński *et al.*⁵⁰ opisali metodę otrzymywania pochodnych maleimidowych amfoterycyny B. W wyniku addycji grupy aminowej do *N*-podstawionych maleimidów otrzymano pochodne **I-III** (Schemat 2). Jedyne pochodna **II** charakteryzowała się aktywnością przeciwgrzybową porównywalną do wyjściowego substratu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



- I R: $-C_2H_5$,
 II R: $-(CH_2)_3N(CH_3)_2$,
 III R: $-(CH_2)_6-N$

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

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



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

Dowiedziano także zależności pomiędzy długością łańcucha węglowego połączonego z atomem azotu, a aktywnością przeciwgrzybową otrzymanych związków. Okazało się, że im dłuższy łańcuch węglowy pochodnej *N*-alkilowej tym słabsze działanie antybiotyku polienowego, natomiast udział dużej ilości

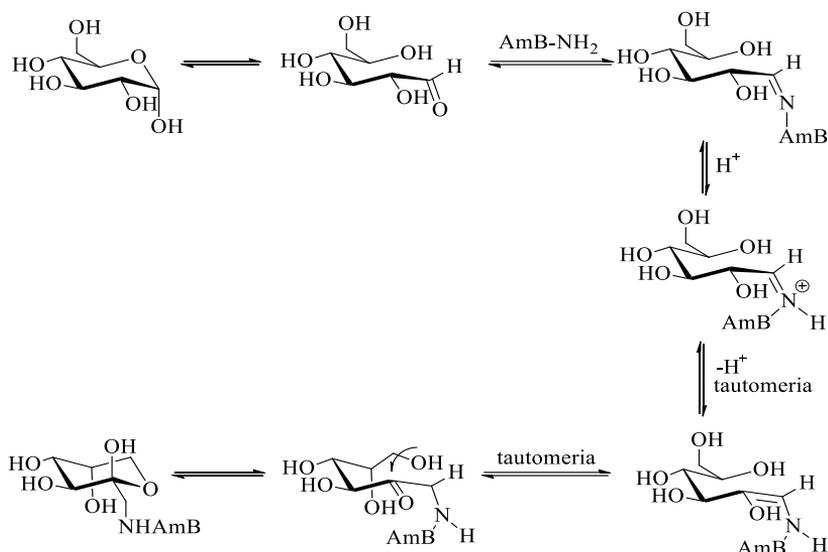


pierwszorzędowych grup aminowych nie wpływa na wzrost aktywności przeciwgrzybowej związku.⁴³

W wyniku reakcji redukcyjnego aminowania otrzymano także pochodne benzytowe. Jako substratów użyto różnie podstawionych aldehydów benzoesowych, zawierających w pierścieniu aromatycznym, zarówno atomy halogenu, jak i grupy: aminową, metoksyową czy hydroksoylową. Otrzymane produkty odznaczały się zdecydowanie lepszą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych, jednakże były nierozpuszczalne w środowisku wodnym. Najbardziej obiecującą aktywność przeciwgrzybową wykazywały pochodne posiadające atom halogenu w pozycji *para* do grupy karbonylowej.⁵³

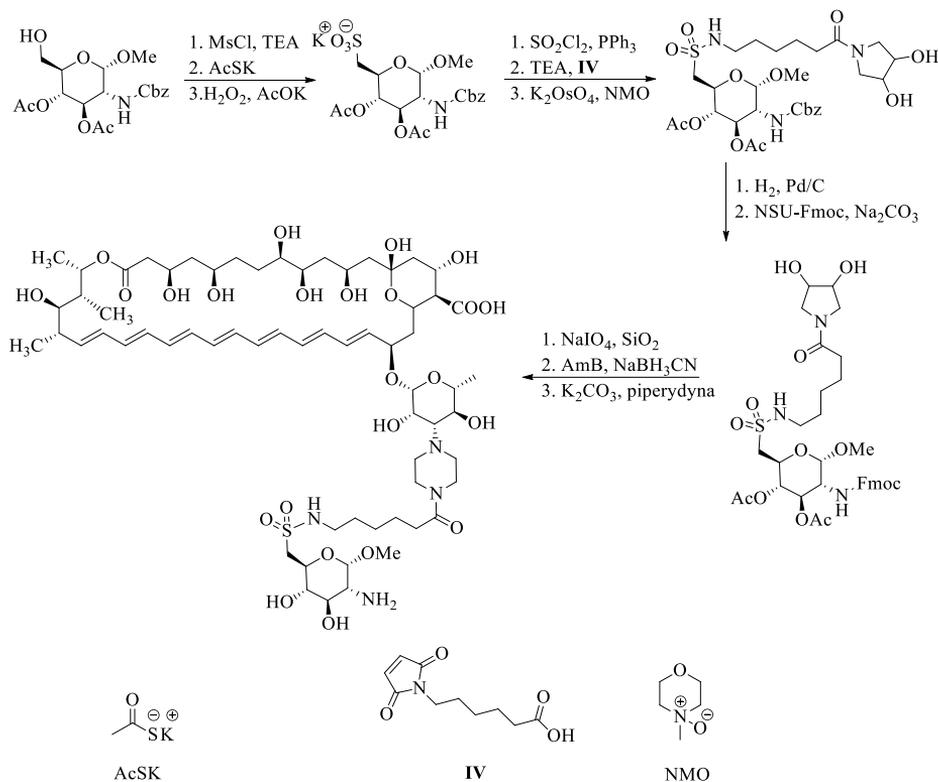
3.1.3. *N*-glikozytowe pochodne makrolidów polienowych

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



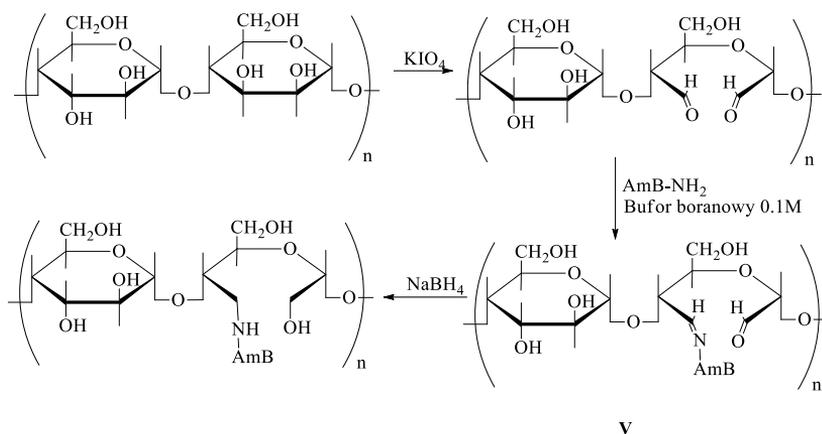
Schemat 4. Mechanizm przegrupowania Amadori na przykładzie cząsteczki glukozy i pierwszorzędowej grupy aminowej amfoterycyny B.

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



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

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



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

3.2. Modyfikacje makrolidów polienowych na grupie karboksylowej

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

3.2.1. Estry makrolidów polienowych

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



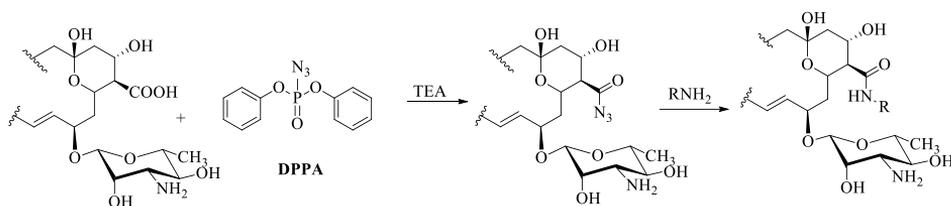
przypadku niższa od związków wyjściowych. Potencjalna toksyczność polienów zależy w znacznym stopniu od ich bardzo małej rozpuszczalności w wodzie w środowisku fizjologicznym.^{61,62} Ze względu na niewielką rozpuszczalność estrów w wodzie, przeprowadzano je w sole. Otrzymano chlorowodorki alkilowych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

3.2.2. Amidy, hydrazydy oraz pochodne mocznikowe makrolidów polienowych

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

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





VI R: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

VII R: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$

VIII R: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$

IX R: $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$

X R: $-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N}-\text{CH}_3$

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

3.3. Modyfikacje aglikonu makrolidów polienowych

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

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

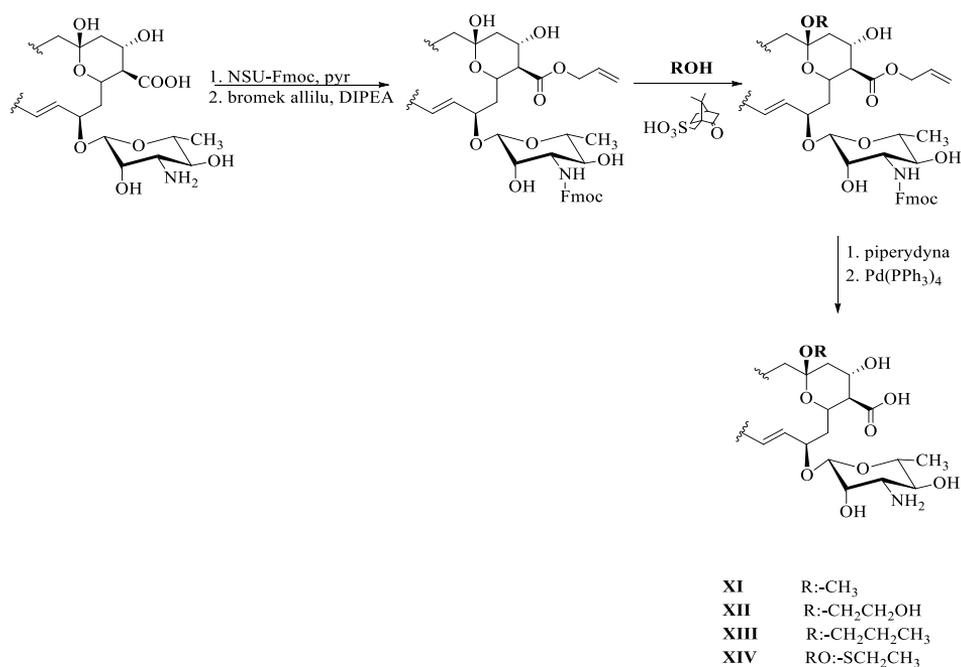
Atom węgla C13 wchodzi w skład ugrupowania hemiketalowego powstałego w wyniku ataku grupy hydroksylowej znajdującej się na atomie węgla C17 na grupę karbonylową (C13).

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



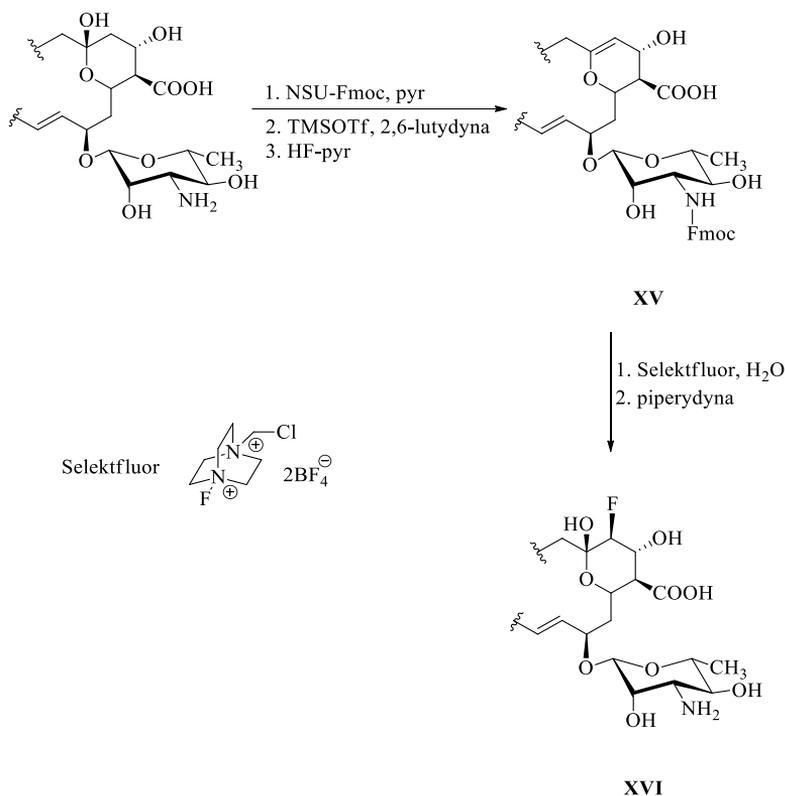
Kolejną modyfikacją było utworzenie pochodnej ketalowej oraz eliminacja cząsteczki wody, co prowadziło do powstania wiązania podwójnego pomiędzy atomami węgla C13-C14. Obydwie te reakcje wymagały ochrony grup: aminowej, karboksylowej oraz hydroksylowych. Proces tworzenia pierścienia ketalowego przeprowadzono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

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



Schemat 8. Tworzenie ugrupowania ketalowego w cząsteczce amfoterycyny B.

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



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

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

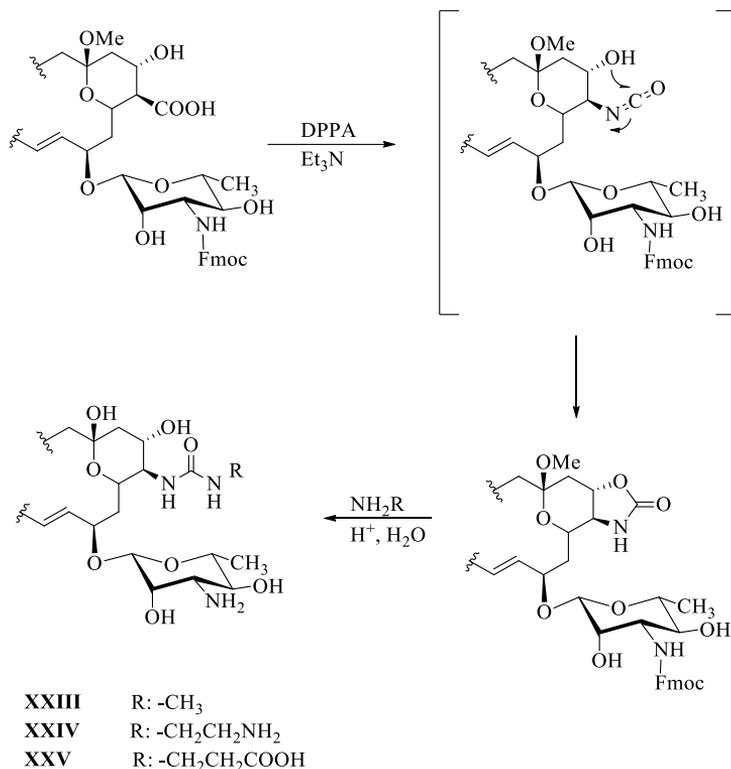


3.3.2. Modyfikacje syntetyczne na atomie węgla C16 amfoterycyny B - redukcja grupy karboksylowej

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

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

otwarcu w łagodnych warunkach pod działaniem amin pierwszorzędowych tworząc pochodne mocznikowe (**Schemat 11**). Związki **XXIII** i **XXIV** wykazują ciekawe właściwości przeciwgrzybowe i są mniej toksyczne niż AmB *in vivo*, ponadto krótka ścieżka syntetyczna, prowadząca do otrzymania tych produktów z dobrą wydajnością, czyni te związki wysoce atrakcyjne do syntezy na skalę przemysłową.^{80,81}



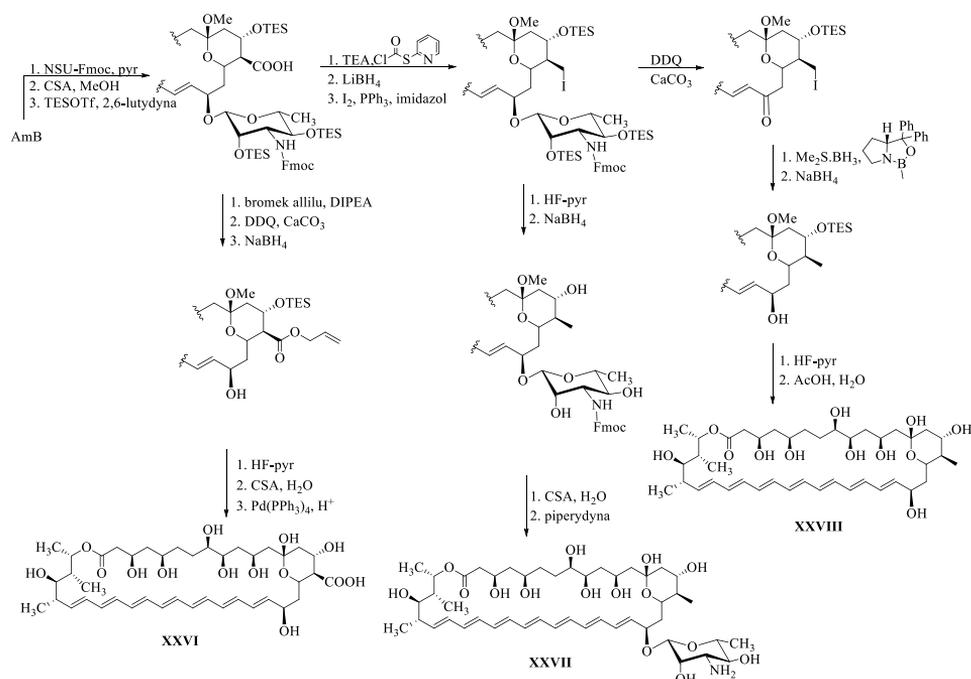
Schemat 11. Synteza pochodnych mocznikowych AmB.

3.3.3. Modyfikacje syntetyczne na atomie węgla C19 amfoterycyny B

Już w 1988 roku naukowcy⁷² po raz pierwszy rozszczepili wiązanie glikozydowe i oddzielili cząsteczkę mykozaminy od pierścienia makrolaktonowego AmB. Reakcję przeprowadzono na całkowicie chronionej cząsteczce amfoterycyny B przy użyciu DDQ. Jednakże nie kontynuowano badań nad aktywnością i dalszymi modyfikacjami aglikonu aż do 2007 roku kiedy to Burke *et al.*⁸² otrzymali pochodne AmB z odłączoną jednostką mykozaminy **XXVI** i **XXVII**, a następnie przebadali je pod kątem ich aktywności biologicznej. Modyfikacje prowadzące do rozerwania wiązania glikozydowego nie należą do najprostszych. Po pierwsze, jak już wcześniej wspomniano, cząsteczka



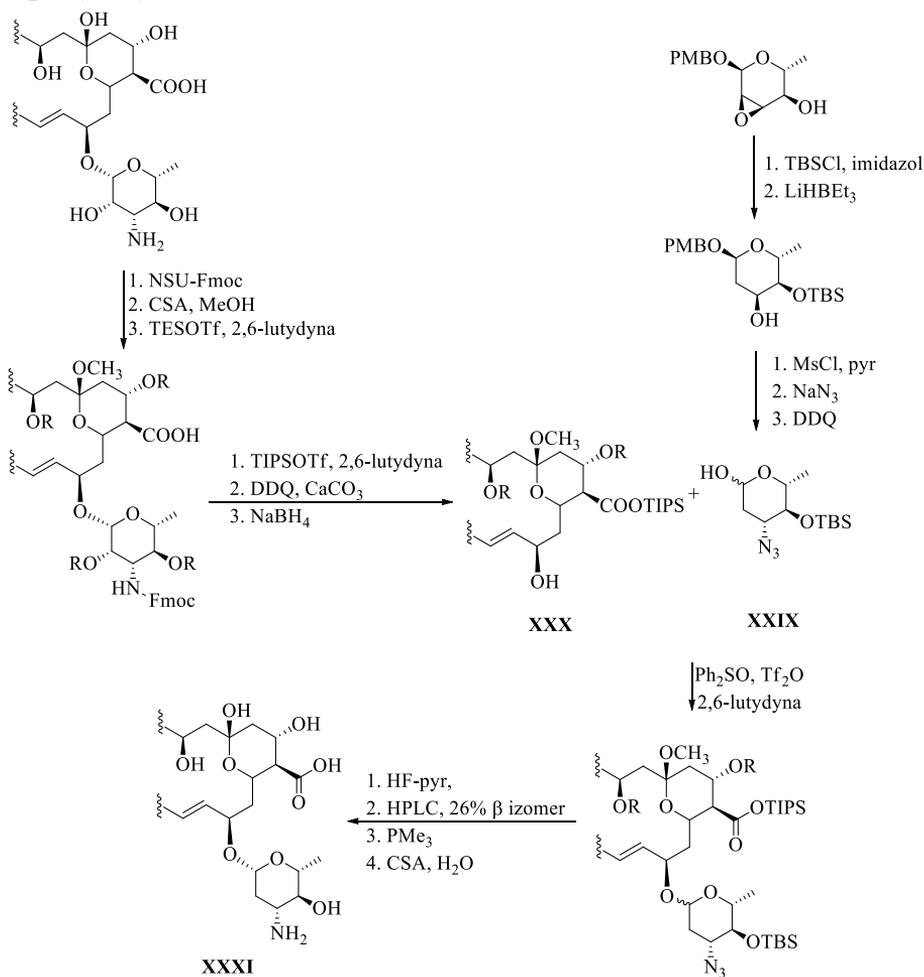
amfoterycyny B jest labilna w drastycznych warunkach reakcji, po drugiej synteza ta jest wieloetapowa. Niektóre z szeregu przeprowadzonych reakcji przedstawiono na **Schemacie 12**. W celu sprawdzenia, wpływu różnych grup funkcyjnych na oddziaływanie z dwuwarstwą lipidową utworzono trzy pochodne. W pierwszej z nich usunięto cząsteczkę mykozaminy (**XXVI**), w drugiej grupę karboksylową na atomie węgla C16 przekształcono w grupę metylową (**XXVII**). Natomiast w trzeciej pochodnej usunięto jednostkę cukrową oraz przekształcono grupę karboksylową w metylową na atomie węgla C16 (**XXVIII**). Zarówno związek **XXVI**, jak i **XXVIII** nie wykazywały aktywności przeciwgrzybowej w stężeniach od pięciu do dziesięciokrotnie większych niż minimalne stężenie hamujące dla amfoterycyny B. Ponadto pochodna **XXVII** okazała się czterokrotnie mniej aktywna niż AmB, zarówno przeciwko szczepowi *Candida albicans*, jak i *Saccharomyces cerevisiae*. Sugeruje to, ważną rolę nie tylko jednostki mykozaminy, ale także grupy karboksylowej w tworzeniu kanałów jonowych w błonach komórek grzybowych. Pochodna, w której brak cząsteczki mykozaminy nie wiąże się tak łatwo z powierzchnią dwuwarstwy lipidowej. Potwierdzały to stwierdzenie, że specyficzne interakcje pomiędzy naładowanymi grupami funkcyjnymi (karboksylową i aminową) powodują łatwiejsze wiązanie cząsteczki polienu z powierzchnią dwuwarstwy lipidowej.^{26,82}



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

3.3.4. Modyfikacje na atomie węgla C'2 makrolidów polienowych

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

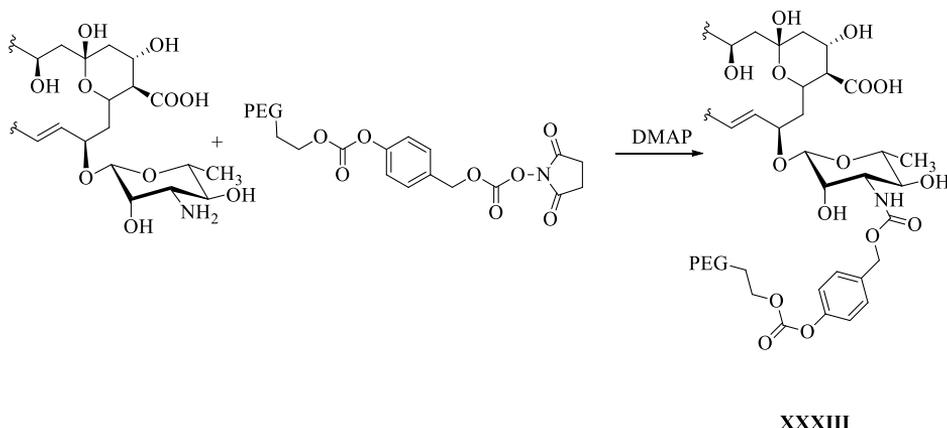
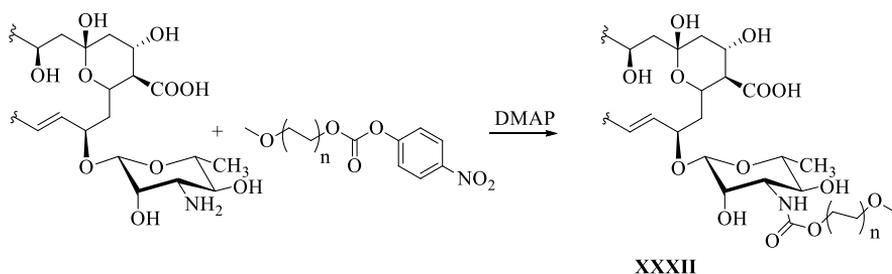


Schemat 13. Przyłączanie cząsteczki cukru do aglikonu amfoterycyny B.

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

3.4. Inne pochodne makrolidów polienowych

Naukowcy poszukując koniugatów polepszających rozpuszczalność makrolidów polienowych oraz ich właściwości farmakokinetyczne skierowali swoje zainteresowanie na tworzenie koniugatów z polimerami. Sedlak *et al.*⁸⁶ jako pierwsi otrzymali pochodne makrolidów polienowych z glikolem metoksypolietylenowym (mPEG). mPEG jest praktycznie nietoksyczny i w łatwy sposób jest usuwany z organizmu przez nerki. Poza tym jego hydrofilowy charakter zapewnia lepszą rozpuszczalność hydrofobowym cząsteczkom tworząc np. stabilizowane układy koloidalne. W wyniku reakcji grupy aminowej cząsteczki AmB z estrem aktywny glikolu metoksypolietylenowego otrzymano pochodną amfoterycyny B **XXXII (Schemat 14)**.⁸⁶ Opracowano także otrzymywanie koniugatów AmB z polietyloglikolem (PEG) wykorzystując łączniki ulegające *in vivo* hydrolizie, która prowadzi do uwolnienia wolnej cząsteczki AmB. Wykorzystując przyłączanie polimerów za pomocą łącznika do cząsteczki leku w łatwy sposób można zmienić farmakokinetykę otrzymywanych produktów. Modyfikując łącznik np. poprzez wprowadzenie grup o dużych wymaganiach sterycznych możemy wpływać na szybkość jego hydrolizy, a tym samym osiągać większą skuteczność leku. Ideę tworzenia pochodnych z wykorzystaniem polimerów i łącznika przedstawiono na przykładzie pochodnej AmB **XXXIII** na **Schemacie 14**.⁸⁷



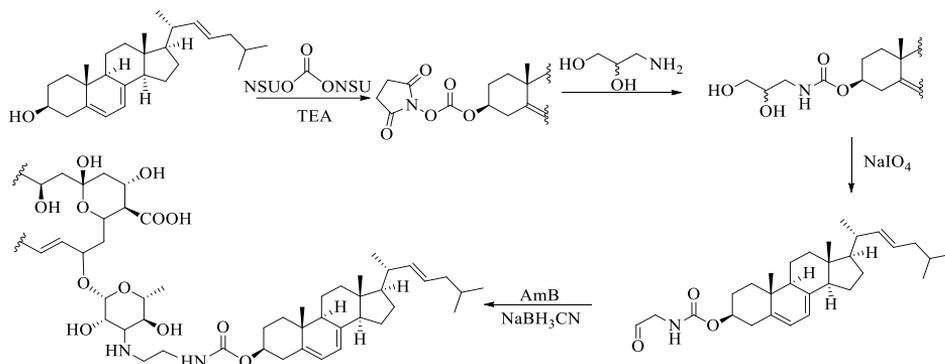
Schemat 14. Tworzenie koniugatów amfoterycyny B z polimerami PEG.

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

Podczas przyłączania cząsteczek fosfolipidów do amfoterycyny B wykorzystano identyczną strategię działania, a mianowicie do grupy aminowej przyłączano fosfolipidy o różnej długości łańcuchów acylowych (od 12 do 18

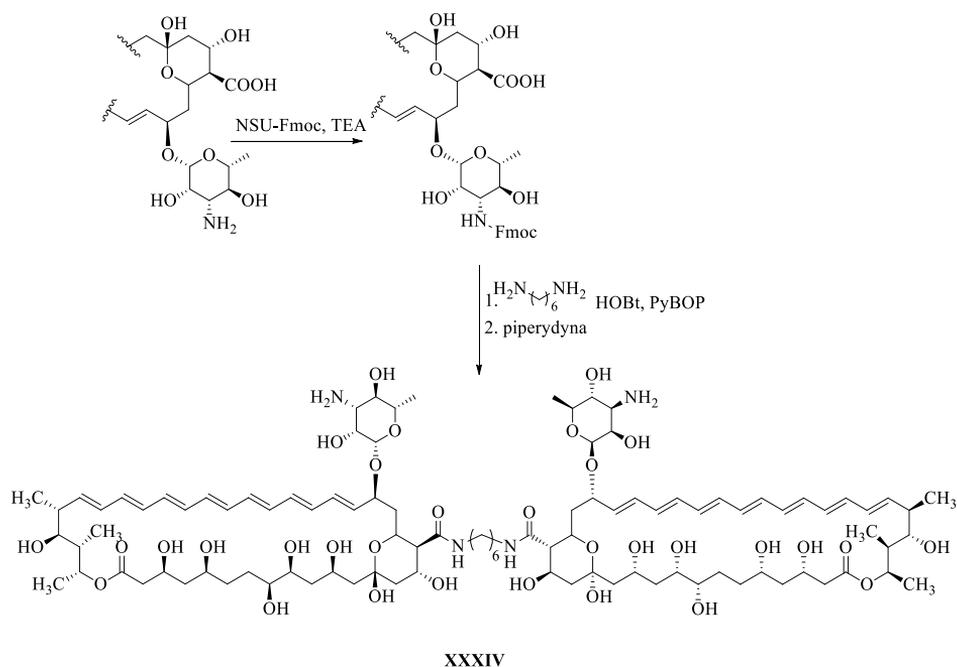


atomów węgla) stosując proces redukcyjnego aminowania. Dowiedziono, iż koniugaty z fosfolipidami C₁₂ i C₁₄ łatwiej tworzyły kanały w błonie komórkowej niż koniugaty C₁₆ i C₁₈.⁸⁹



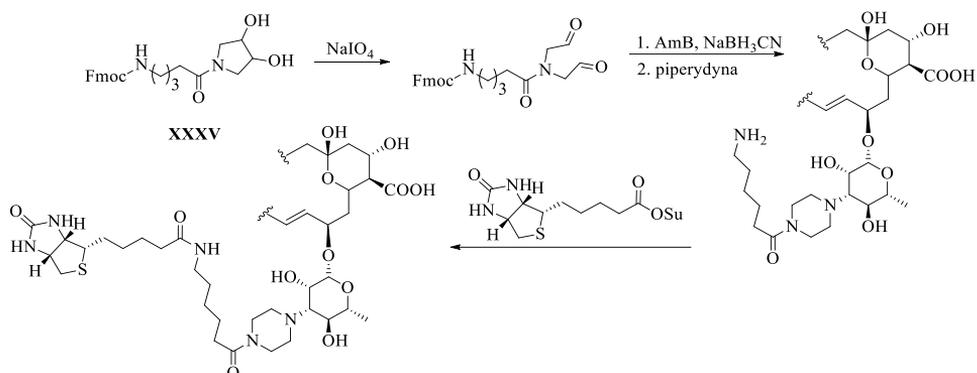
Schemat 15. Synteza koniugatu amfoterycyny z ergosterolem.

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



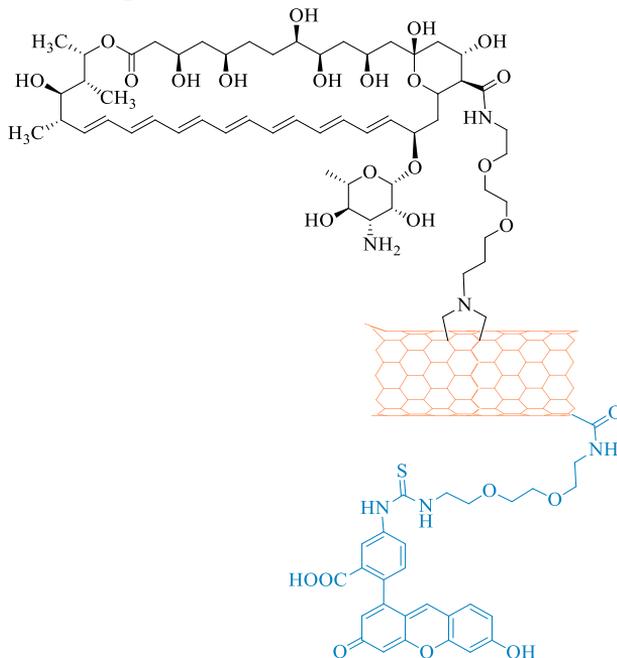
Schemat 16. Synteza dimerów amfoterycyny B z wolną grupą aminową.

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



Schemat 17. Przyłączenie biotyny do cząsteczki amfoterycyny B z wykorzystaniem łącznika piperazyнового.

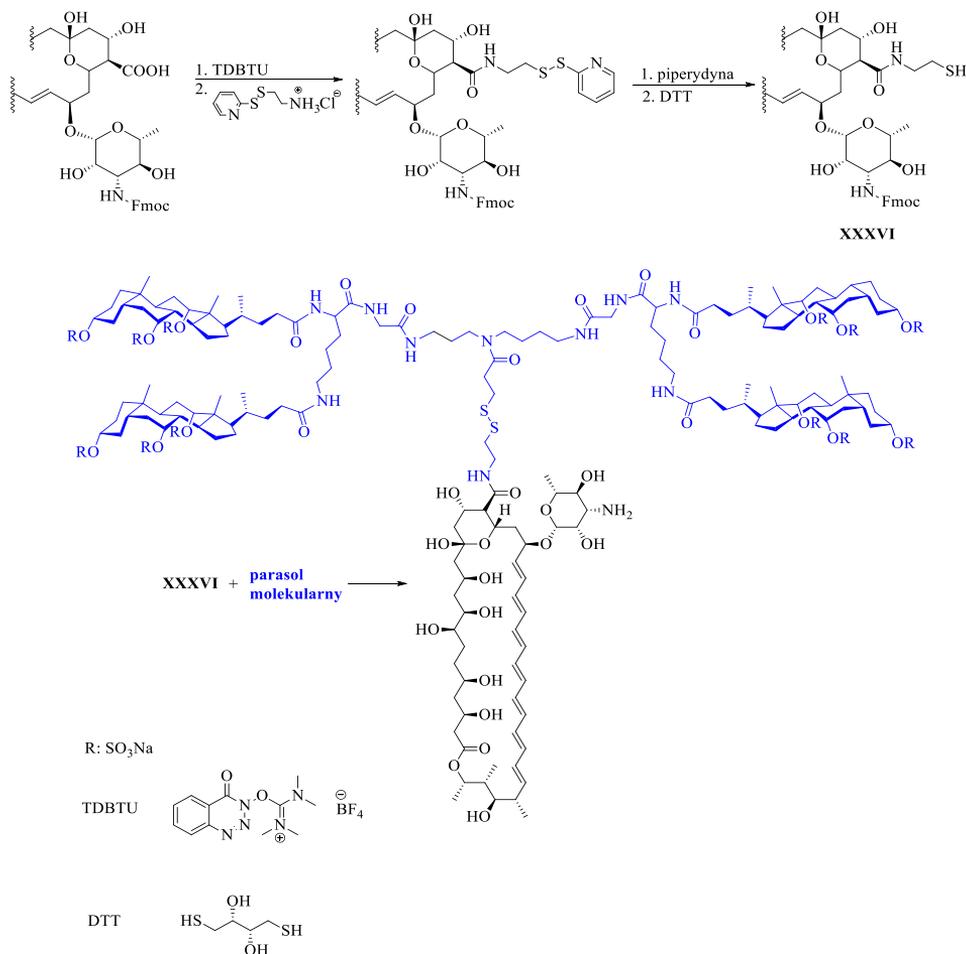
W ostatnich dziesięcioleciach obserwuje się dynamiczny rozwój chemii supramolekularnej, która znajduje także zastosowanie w medycynie. Funkcjonalizowane nanorurki i parasole molekularne (MU) okazały się dogodnym środkiem w dostarczaniu leków do komórek. Udało się otrzymać nanorurki zawierające, zarówno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



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



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

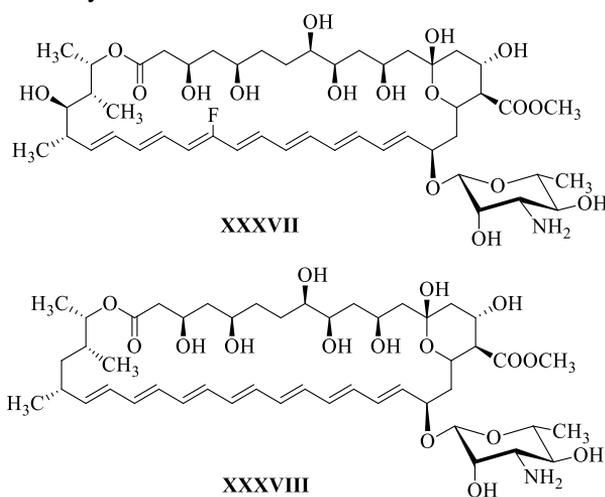


Schemat 18. Sprzęganie ‘parasola molekularnego’ z cząsteczką AmB.

4. Synteza *de novo* półsyntetycznych analogów amfoterycyny B

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

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



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

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



Cel i zakres pracy

Celem pracy było zbadanie możliwości chemicznych modyfikacji amfoterycyny B i nystatyny A₁ w dwóch głównych kierunkach: a) wymiany reszty mykozaminy na inny fragment o podobnym charakterze oraz b) przyłączenia do grupy karboksylowej pochodnych kwasu cholowego i deoksycholowego, tzw. ‘parasoli molekularnych’.

Zakres przeprowadzonych badań w ramach kierunku a) obejmował:

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

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

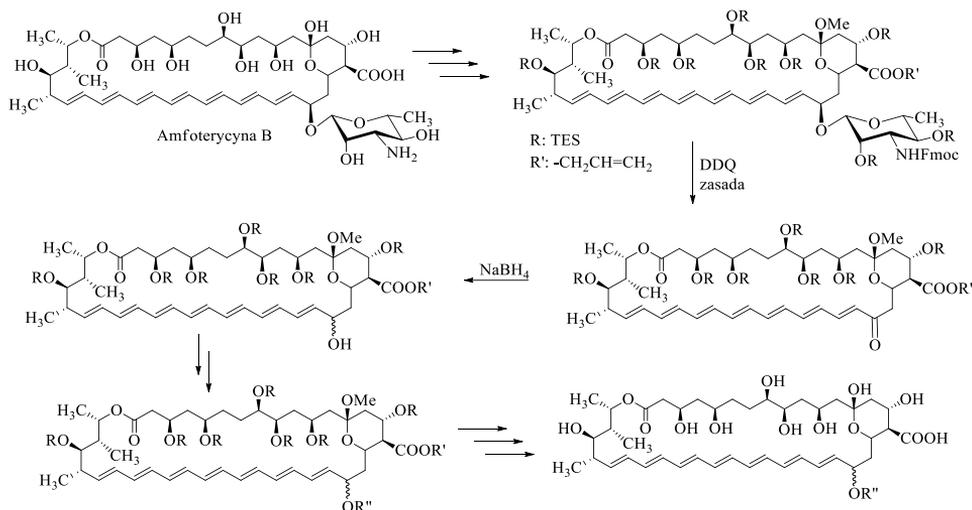
Wyniki i dyskusja

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

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

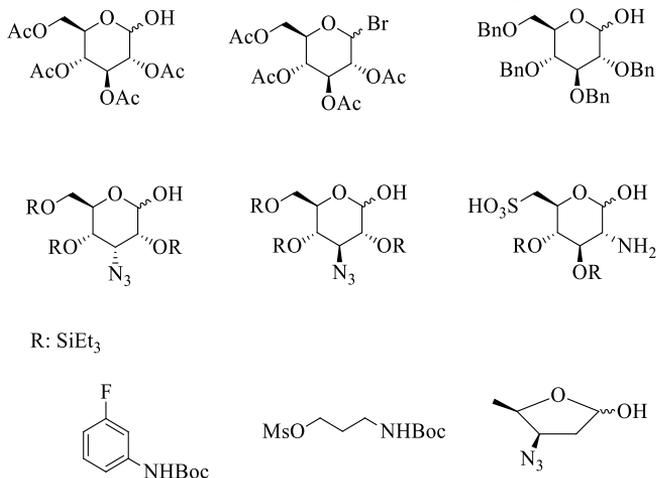


alternatywą otrzymywania hemisyntetycznych makrolidów polienowych. Otrzymane w taki sposób, nowe cząsteczki mogłyby charakteryzować się obniżoną toksycznością wobec komórek ssaczy przy wciąż wysokiej aktywności przeciwgrzybowej.



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

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



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

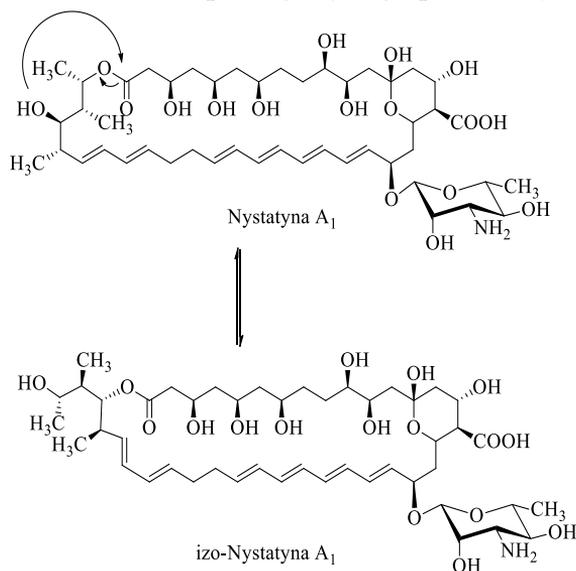


Wykorzystane przeze mnie komponenty niecukrowe (**Rysunek 8**) były dostępne komercyjnie, jednak należało przeprowadzić je w odpowiednio chronione pochodne. Natomiast pochodne cukrowe, które zaplanowałam przyłączyć do aglikonu amfoterycyny B otrzymałam w wyniku zaprojektowanych syntez z dostępnej komercyjnie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



1. Synteza aglikonów makrolidów polienowych

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



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



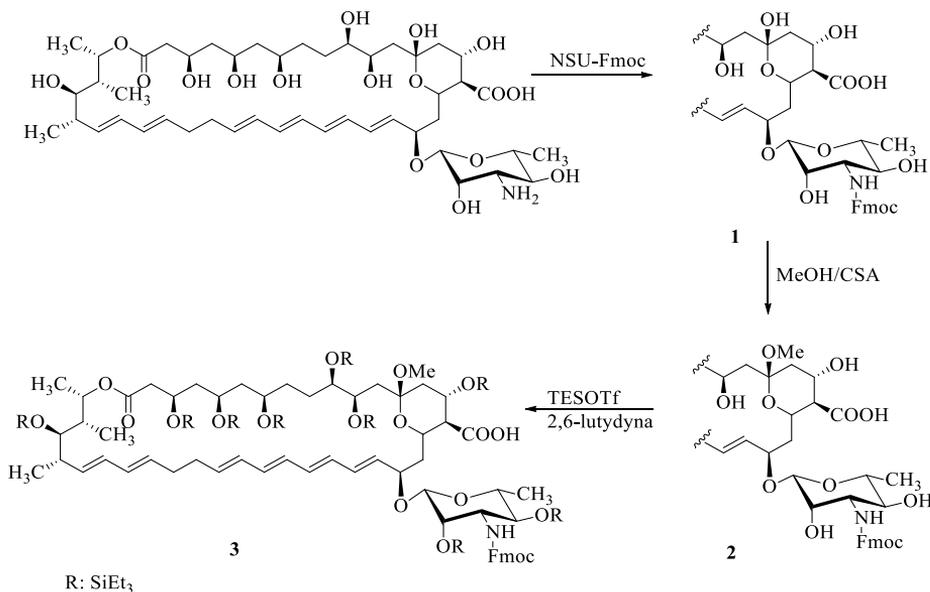
Jak już wcześniej wspomniałam, w makrolidach polienowych występuje wiele grup funkcyjnych, które należało ochronić, uwzględniając warunki, w których cząsteczki te nie ulegają degradacji. Dlatego też grupy ochronne wybierałam w taki sposób, aby zarówno ich zakładanie, jak i usuwanie przebiegało w możliwie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

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



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

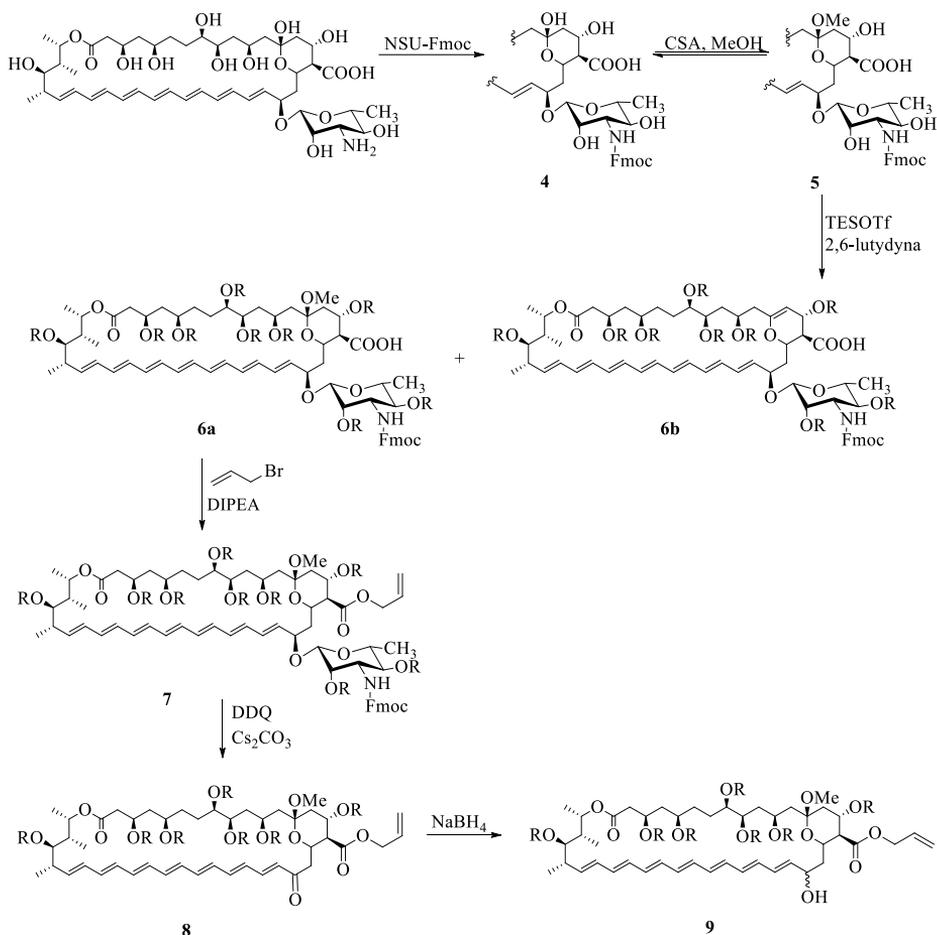




Schemat 20.

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





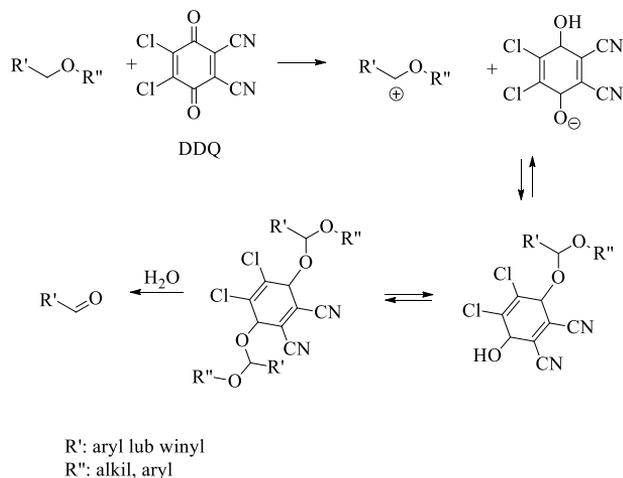
Schemat 21.

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

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



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



Schemat 22.

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



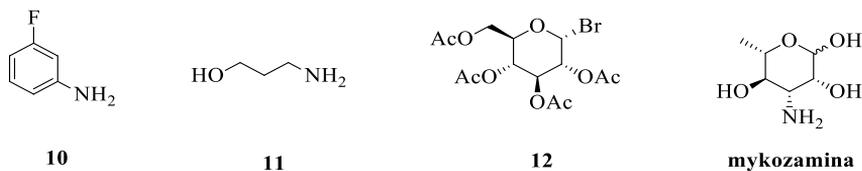
Struktury wszystkich otrzymanych i wyizolowanych związków potwierdziłam na podstawie widm ^1H NMR oraz mas.

2. Próby otrzymywania półsyntetycznych analogów amfoterycyny B

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

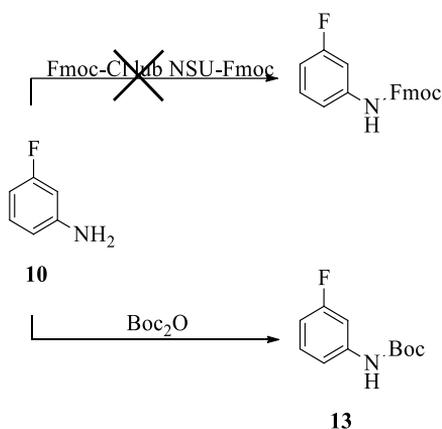
2.1. Badania reakcji substytucji nukleofilowej z udziałem aglikonu AmB

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



Rysunek 10.

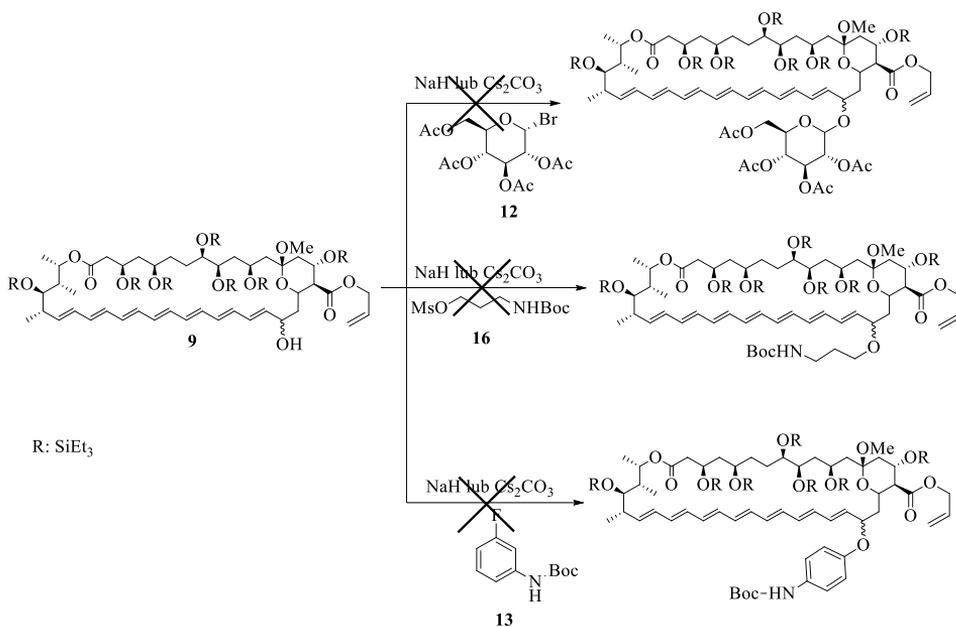
Aby było możliwe utworzenie wiązania eterowego pomiędzy alkoholem makrolidowym **9** a *m*-aminofluorobenzenem **10** należało jedynie ochronić grupę aminową. Z całej gamy grup ochronnych z kilku przyczyn, o których już niejednokrotnie mówiłam, wybrałam grupę *N*-fluorenylometoksykarbonylową – Fmoc.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



Schemat 23.

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





Schemat 25.

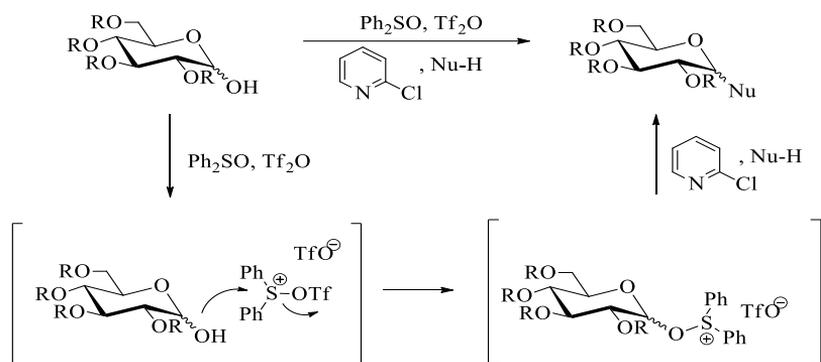
2.2. Badanie reakcji dehydracyjnej glikozylacji

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

2.2.1. Synteza hemisyntetycznych amfoterycyn

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





R - grupa ochronna

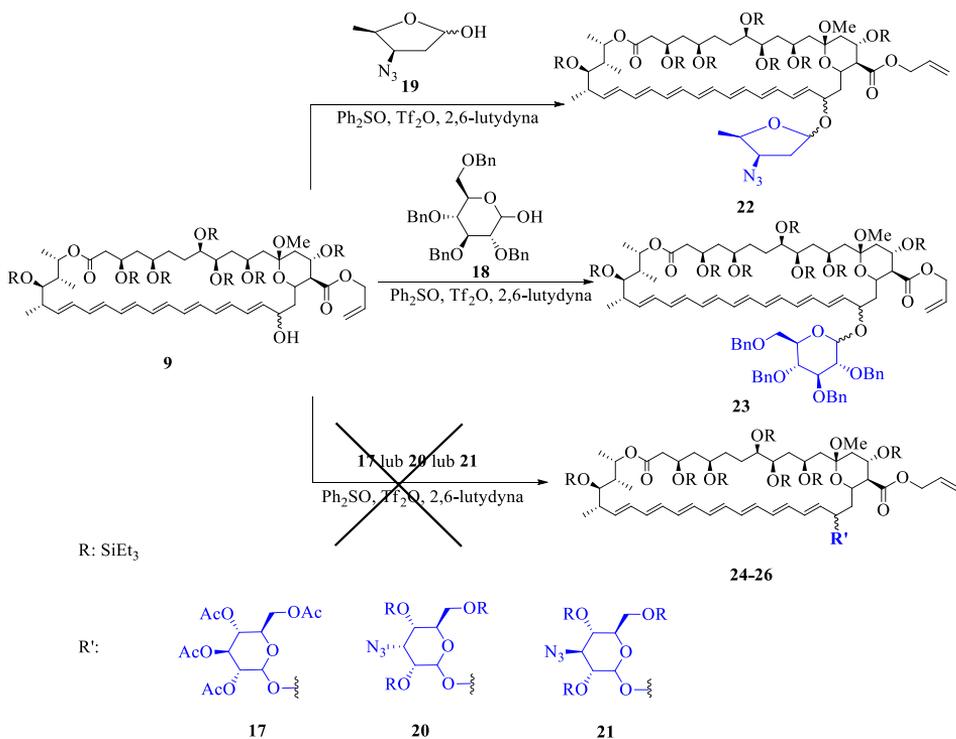
Schemat 26. Mechanizm dehydracyjnej glikozylacji.

Wykorzystując przedstawioną powyżej metodę tworzenia wiązania glikozydowego podjęłam próbę przyłączenia pochodnych cukrowych do aglikonu amfoterycyny B **9**. Ze względu na wysoką labilność oraz dużą reaktywność intermedatów tworzących się podczas dehydracyjnej glikozylacji prowadziłam reakcję w atmosferze argonu, w obniżonej temperaturze oraz bez dostępu wilgoci. Kluczowa dla prawidłowego przebiegu reakcji jest ścisła kontrola temperatury mieszaniny reakcyjnej, którą należało zmieniać w następujący sposób: $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ w momencie wkraplania bezwodnika trifluorometanosulfonowego oraz $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ w trakcie dodawania akceptora do donora cukrowego. Ponieważ większość doniesień literaturowych jako akceptor pary elektronowej nukleofila stosuje benzylo pochodne cukrów pierwsze próby połączenia aglikonu AmB **9** z jednostką cukrową przeprowadziłam wykorzystując jako substrat benzyloglukopiranozę **18**. Postępując zgodnie z wyżej wymienionymi wytycznymi prowadzenia reakcji glikozylacji przebadalam możliwości przyłączenia następujących pochodnych cukrowych do aglikonu **9**: 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-D-glukopiranozy **17**, 2,3,4,6-tetra-*O*-benzylo-D-glukopiranozy **18**, 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksylozy **19**, 2,4,6-*tri-O*-trietylosililo-3-azydo-D-allopiranozy **20** oraz 2,4,6-*tri-O*-trietylosililo-3-azydo-D-glukopiranozy **21**. Przyłączenie pochodnych cukrowych **18** i **19** do aglikonu AmB zakończyło się sukcesem, jednak wydajność tych reakcji była bardzo niska. W przypadku pochodnej ksylozy niska wydajność reakcji mogła być spowodowana występowaniem pochodnej deoksyrybozy w trzech formach: liniowej oraz dwóch anomerów zamkniętych w pierścien furanozowy, co stwierdziłam spektroskopowo. Ponadto hemisyntetyczna amfoterycyna **22** po pomierzeniu widm magnetycznego rezonansu jądrowego uległa degradacji. Natomiast 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-D-glukopiranoza **17** prawdopodobnie nie tworzyła aktywnego intermediatu pod działaniem difenylosulfotlenku oraz



bezwodnika trifluorometanosulfonowego o czym donosi także literatura.¹¹⁸ Po wkropleniu Tf_2O mieszanina czerniała, a substrat ulegał rozkładowi. W przypadku chronionych pochodnych allozy **20** oraz glukozy **21** nie obserwowałam tworzenia pożądanego produktu, a z mieszaniny reakcyjnej izolowałam substraty użyte do reakcji. Wydłużenie czasu reakcji, dodatek sit molekularnych 3Å dla zapewnienia bezwodnych warunków podczas reakcji oraz przeprowadzenie jej na linii schlenka również nie dawało pożądaných produktów, a także nie skutkowało wzrostem wydajności reakcji. Zarówno pochodna allozy **20**, jak i glukozy **21**, charakteryzują się znaczną zawadą przestrzenną wokół anomerycznego atomu węgla i to może być przyczyną zmniejszenia reaktywności w reakcji dehydracyjnej glikozylacji, pomimo że jest to metoda zalecana dla aglikonów o dużych wymaganiach przestrzennych. Struktury wszystkich produktów pośrednich i końcowych potwierdziłam widmami mas i NMR.

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

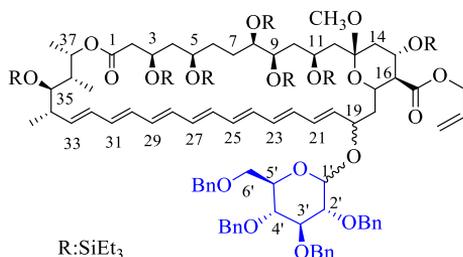


2.3. Interpretacja widm korelacyjnych otrzymanych koniugatów AmB

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

W widmach typu HSQC widoczne są sprzężenia ^1H - ^{13}C atomów bezpośrednio ze sobą połączonych, natomiast w eksperymencie HMBC sygnały ujawniają połączenie ^1H - ^{13}C przez wiele wiązań chemicznych. Najczęściej widoczne są sygnały korelacyjne obrazujące oddziaływanie spinowo-spinowe pomiędzy atomami wodoru i węgla oddalonymi od siebie o dwa, bądź trzy wiązania chemiczne. Eksperymenty DOSY pozwalają na rozróżnienie związków nieidentycznych spektroskopowo, na podstawie ich odmiennych współczynników dyfuzji, które zależą od wielkości i kształtu cząsteczek. Dyfuzyjny NMR może być zastosowany do określenia: czy badana próbka jest mieszaniną kilku związków, wielkości cząsteczek i agregatów, stopnia polimeryzacji, wielkości powłoki solwacyjnej lub innej struktury mikroskopowej. Ze względu na złożoną strukturę koniugatów makrolidów polienowych, podjęto się interpretacji fragmentów widm, w których znaleziono sygnały korelacyjne potwierdzające występowanie wiązania glikozydowego w cząsteczkach otrzymanych związków.

Rysunek 11 przedstawia koniugat AmB z cząsteczką 2,3,4,6-tetra-*O*-benzylo-D-glukopiranozy **23** z ponumerowanymi atomami węgla w celu łatwiejszej interpretacji wykonanych widm.

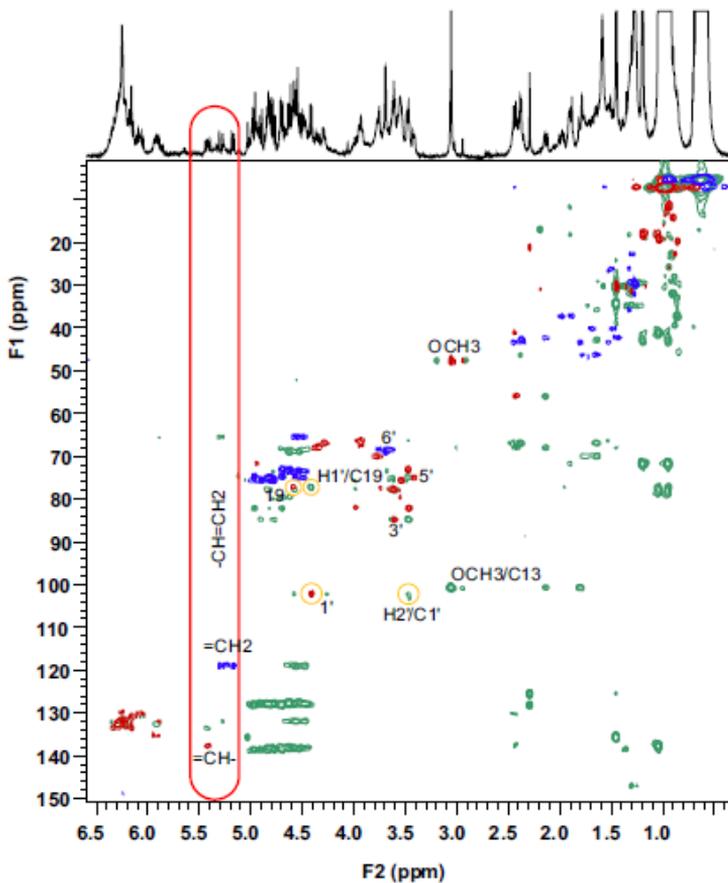


Rysunek 11. Koniugat AmB z cząsteczką 2,3,4,6-tetra-*O*-benzylo-D-glukopiranozy **23**

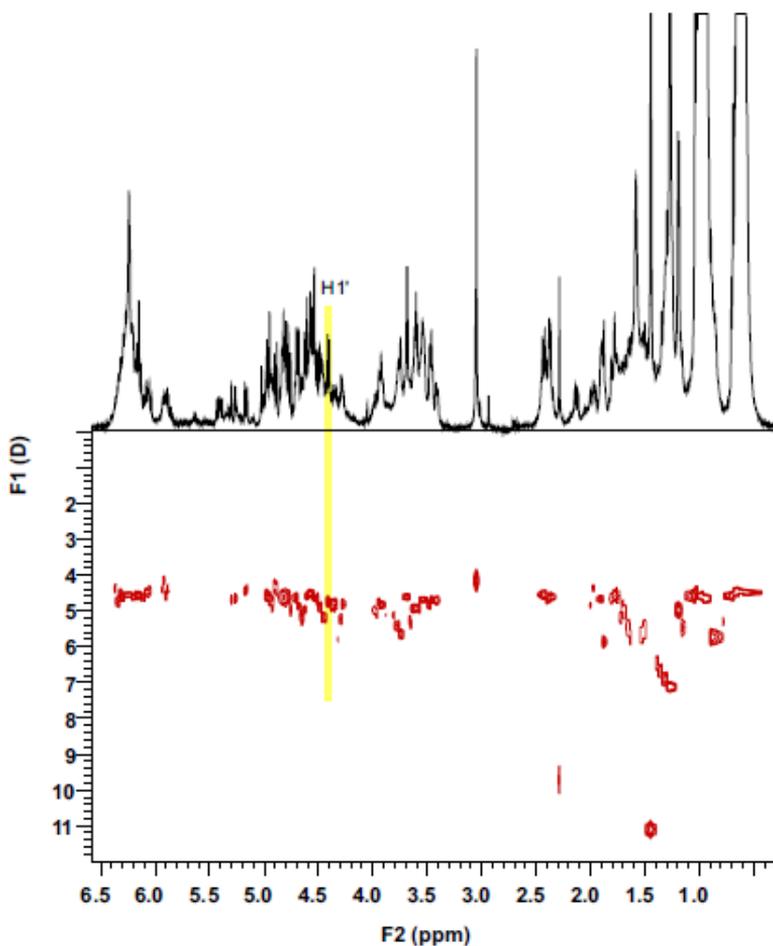
Zmierzone i nałożone na siebie widma HMBC oraz HSQC koniugatu AmB z cząsteczką 2,3,4,6-tetra-*O*-benzylo-D-glukopiranozy **23** widoczne są na **Rysunku 12**. Kolorem zielonym zaznaczone są sygnały widoczne na widmie HMBC. Sygnały widoczne na widmie HSQC mają kolor czerwony – grupy CH oraz CH₃, natomiast grupy CH₂ mają na rysunku kolor niebieski. Sygnał korelacyjny ^1H - ^{13}C o przesunięciu chemicznym $\delta_{\text{C}}=83$ ppm i $\delta_{\text{H}}=4.41$ ppm



odpowiada sprzężeniu protonu H1', który znajduje się na anomerycznym atomie węgla w 2,3,4,6-tetra-*O*-benzylo-D-glukopiranozie, a atomem węgla C19. Sygnał ten jest dowodem na występowanie w cząsteczce wiązania glikozydowego pomiędzy aglikonem amfoterycyny B a jednostką cukru. Na widmie widoczna jest również korelacja w drugim ugrupowaniu ketalowym, pomiędzy protonami w grupie OCH₃ ($\delta_H=3.07$ ppm) a atomem węgla C13 ($\delta_C=100$ ppm).



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



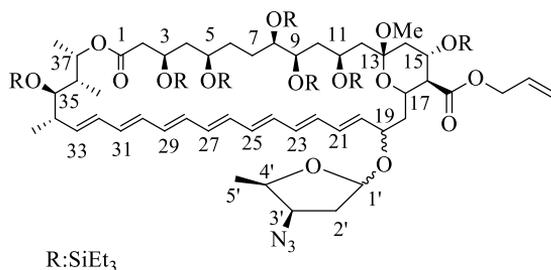
Rysunek 13. Widmo DOSY dla koniugatu **23**.

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

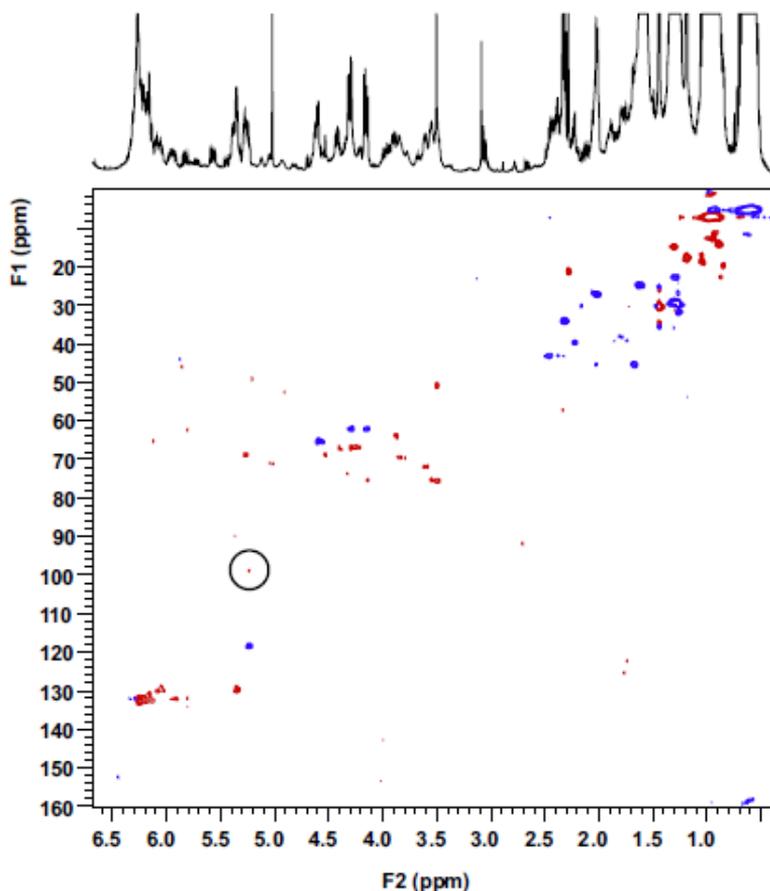
Strukturę koniugatu **22** amfoterycyny B z cząsteczką 2,3,5-trideoksy-3-azydo-D-ksylofuranozy (**Rysunek 14**) także potwierdzono za pomocą widm dwuwymiarowych (**Rysunek 15**), jednakże ze względu na mniejszą ilość badanego związku oraz jego labilność w warunkach pomiarów ^1H NMR jakość widm jest gorsza, a intensywność sygnału świadcząca o obecności wiązania glikozydowego niższa niż dla koniugatu **23**. Sygnały widoczne na widmie HSQC mają kolor czerwony – grupy CH oraz CH_3 , natomiast grupy CH_2 mają na rysunku



kolor niebieski. Sprzężeniu pomiędzy wodorem na anomerycznym atomie węgla C1' a atomem węgla C19 w aglikonie AmB odpowiada sygnał o przesunięciu chemicznym $\delta_C=99$ ppm i $\delta_H=5.2$ ppm.



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



Rysunek 15. Widmo HSQC dla koniugatu 22.

3. Synteza pochodnych aminocukrowych

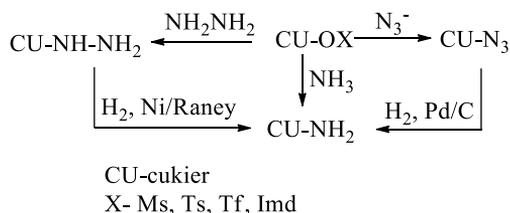
Równoległe do syntez prowadzonych na cząsteczkach makrolidów polienowych należało zaplanować ścieżki syntetyczne umożliwiające otrzymanie pochodnych cukrowych, które następnie miały zostać wykorzystane w reakcjach tworzenia koniugatów z aglikonem amfoterycyny B. W tym celu przeprowadziłam wnikliwy przegląd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

3.1. Przegląd literaturowy syntez pochodnych aminocukrów

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

3.1.1. Synteza aminocukrów z wykorzystaniem reakcji substytucji nukleofilowej (S_N2).

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

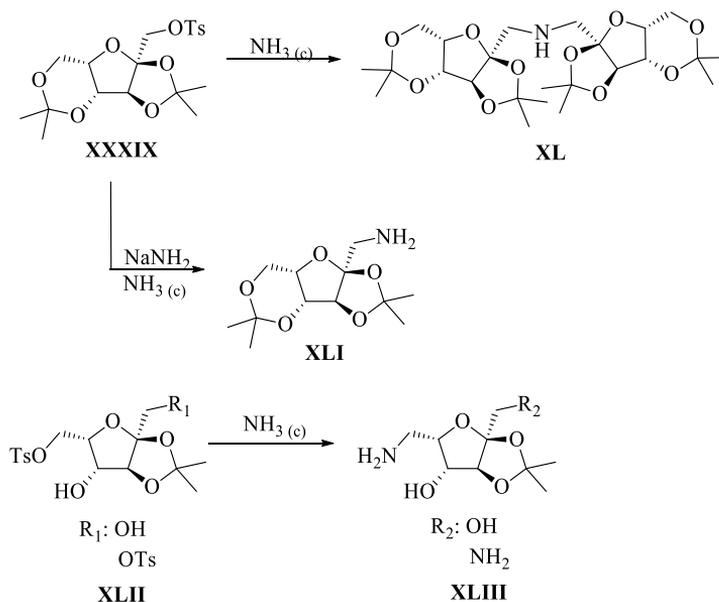


Schemat 28. Wykorzystanie reakcji substytucji nukleofilowej w syntezie aminocukrów.



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

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

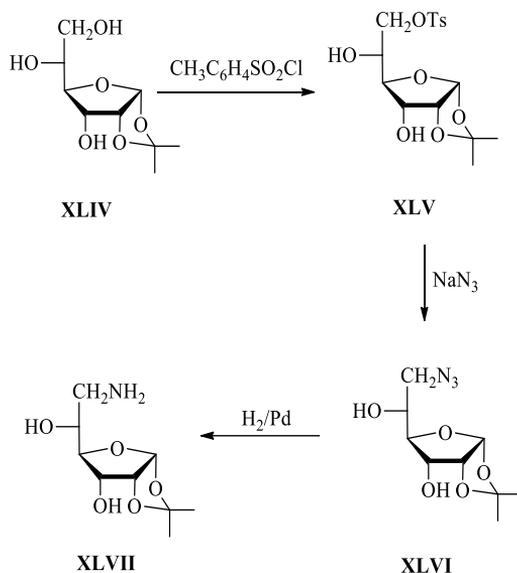


Schemat 29. Otrzymywanie aminocukrów przy użyciu ciekłego amoniaku jako reagenta o charakterze nukleofilowym.

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



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

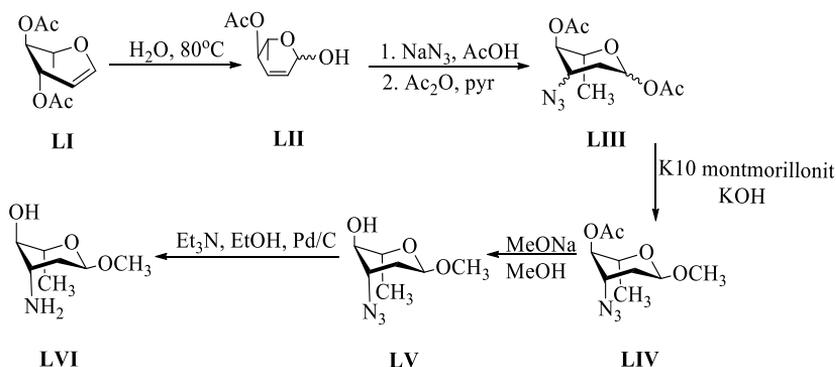


Schemat 30. Otrzymywanie 6-amino-6-deoksy-1,2-*O*-izopropylideno- α -D-allofuranozy z wykorzystaniem azydku sodu w reakcji S_N2.¹¹⁹

3.1.2. Synteza aminocukrów z wykorzystaniem pochodnych epoksydowych

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

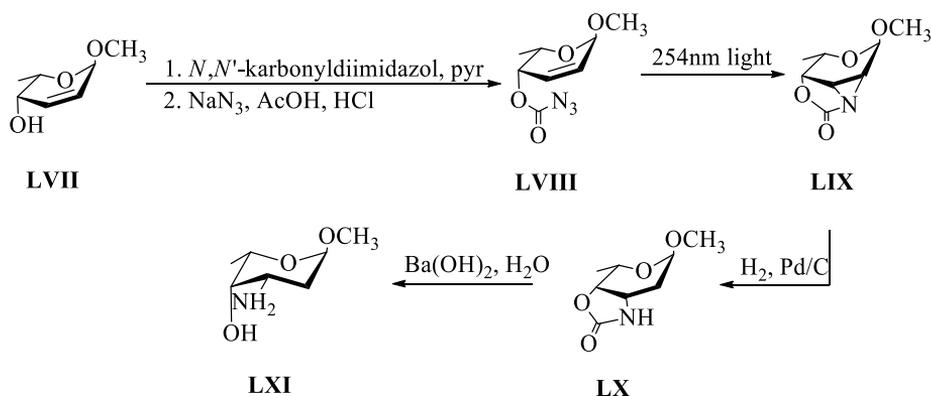




Schemat 32. Synteza glikozydu metylowego azokaminy w wyniku reakcji addycji jonu azydowego do wiązania podwójnego glukoalu.

3.1.3.2. Fotoindukowane tworzenie pierścienia azyrydynowego w glukoalch

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

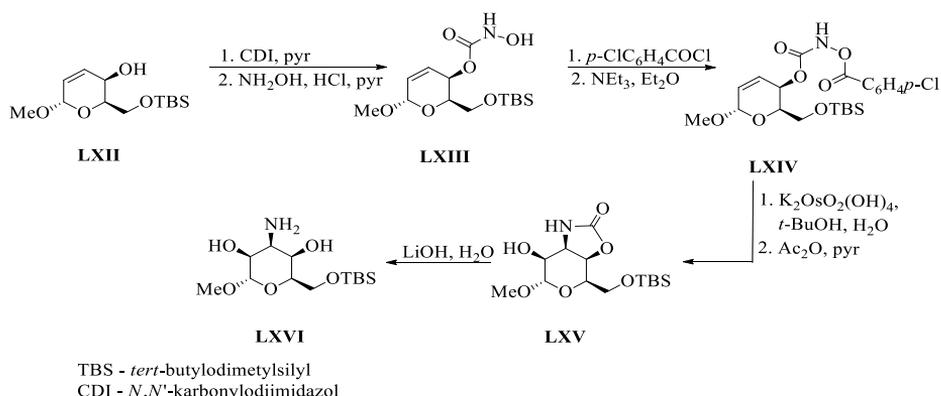


Schemat 33. Synteza L-daunozaminy.



3.1.3.3. Asymetryczna aminohydroksylacja glukali

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

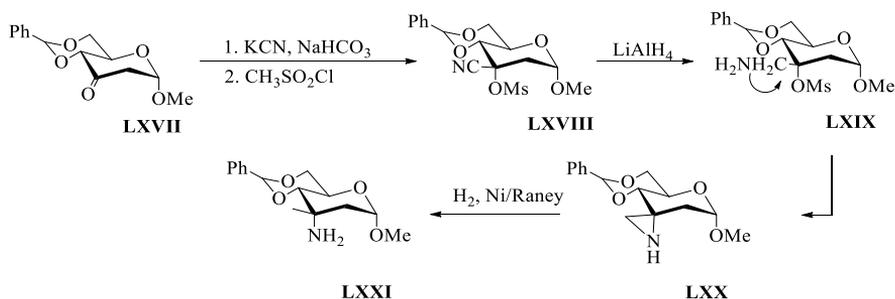


Schemat 34. Otrzymywanie pochodnej 3-amino-3-deoksy- α -D-talopiranozydu w reakcji asymetrycznej aminohydroksylacji katalizowanej pochodnymi osmu.

3.1.4. Addycja jonu cyjankowego do grupy karbonylowej cukru

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





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

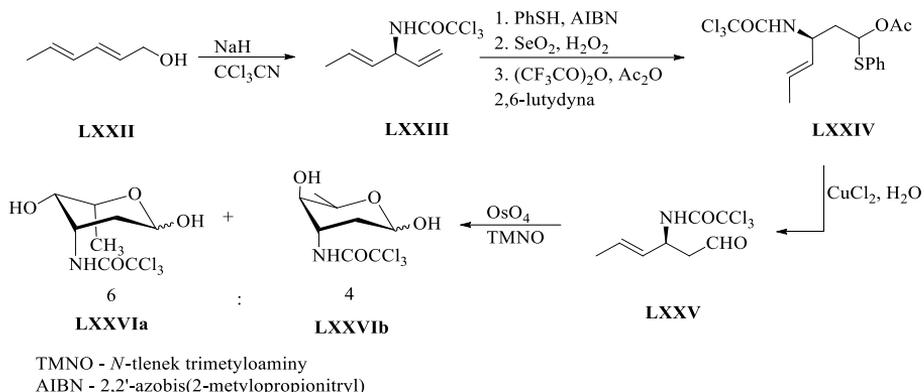
3.1.5. Synteza totalna aminocukrów

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

3.1.5.1. Synteza *de novo* aminocukrów z alkoholi

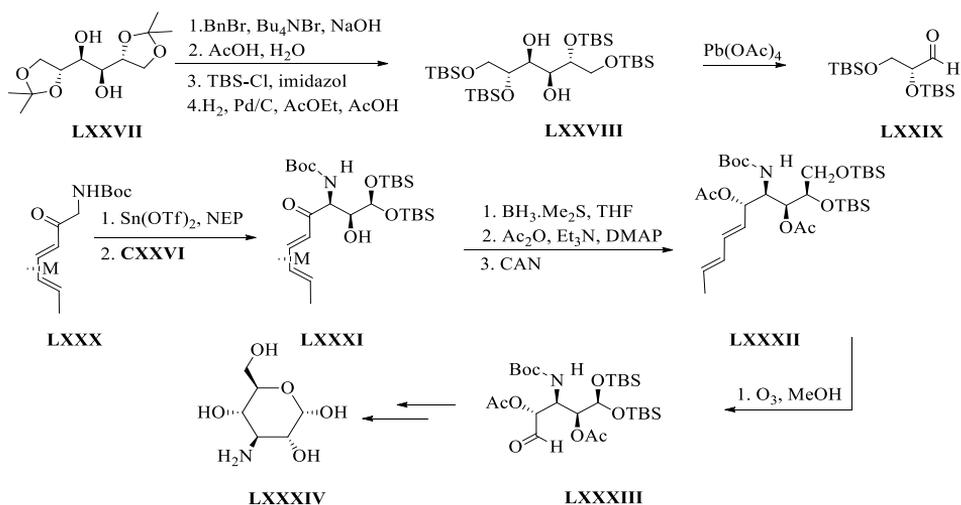
Alkohole zawierające w swojej strukturze wiązania wielokrotne są wykorzystywane jako substraty w syntezie amino-trideoksycukrów. Stereoselektywna synteza pochodnych *N*-trichloacetylo-*L*-daunozaminy, *L*-ristozaminy oraz *L*-wankozaminy z nienasyconych alkoholi została zaproponowana i opisana przez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





Schemat 36. Synteza pochodnej daunosaminy z dienolu.

Schemat 37 przedstawia syntezę D-kanozaminy z komercyjnie dostępnego alkoholu – mannitolu. Substrat **LXXVII**, przekształcono w chroniony aldehyd glicerynowy **LXXIX**, który poddano krzyżowej kondensacji aldolowej z aminoketonem **LXXX** w obecności katalitycznych ilości $\text{Sn}(\text{OTf})_2$. Następnie przeprowadzono stereoselektywną redukcję ugrupowania ketonowego działając kompleksem boran:siarczek dimetylu na aldol **LXXXI**. Zastosowanie azotanu cerowo-amonowego $[\text{CAN}, (\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$ pozwoliło na uwolnienie dienu z kompleksu z żelazem. Ozonoliza z następczą redukcją grupy aldehydowej doprowadziły w konsekwencji do powstania kanozaminy **LXXXIV**.¹⁶²



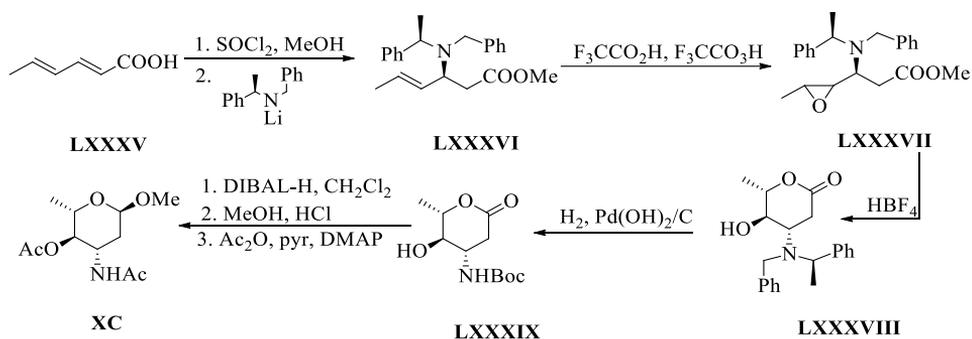
NEP - *N*-etylopiperydyna
 M - $\text{Fe}(\text{CO})_3$

Schemat 37. Totalna synteza D-kanozaminy.



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

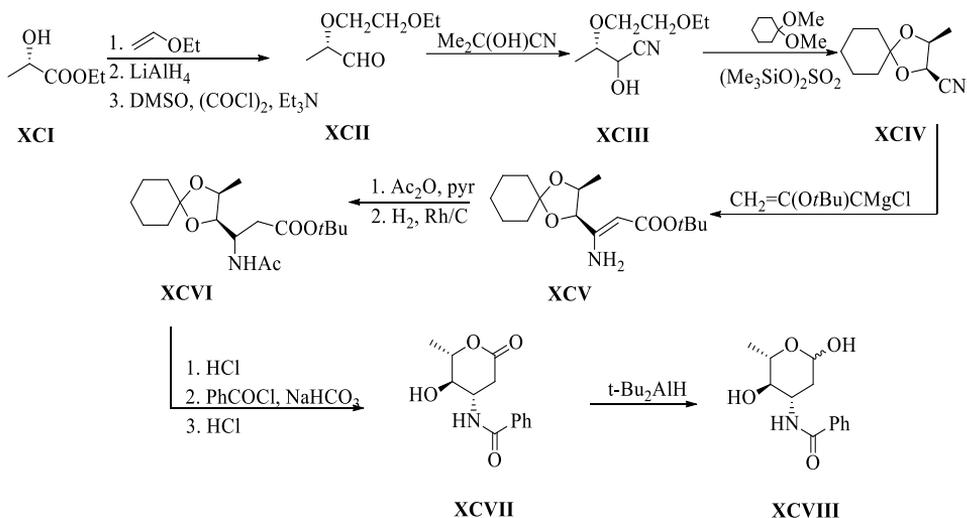
Związki tytułowe wykorzystywane są przede wszystkim w syntezie aminodideoksy – bądź aminotrideoksyaminocukrów. Bagal *et al.*¹⁶³ opisali siedmioetapową syntezę L-akozaminy **XC**, w której substratem był kwas sorbinowy (**Schemat 38**). Sorbinian metylu poddano reakcji addycji z *R-N*-benzylo-*N*-(α -metylobenzylo)amidkiem litu otrzymując aminoester **LXXXVI**. Utlenienie wiązania podwójnego za pomocą nadkwasu trifluorooctowego prowadziło do powstania nietrwałego epoksydu **LXXXVII**, który pod działaniem kwasu tetrafluoroborowego natychmiast przekształcał się w lakton **LXXXVIII**. W wyniku sekwencji czterech kolejnych reakcji otrzymano pochodną L-akozaminy **XC**.¹⁶³



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

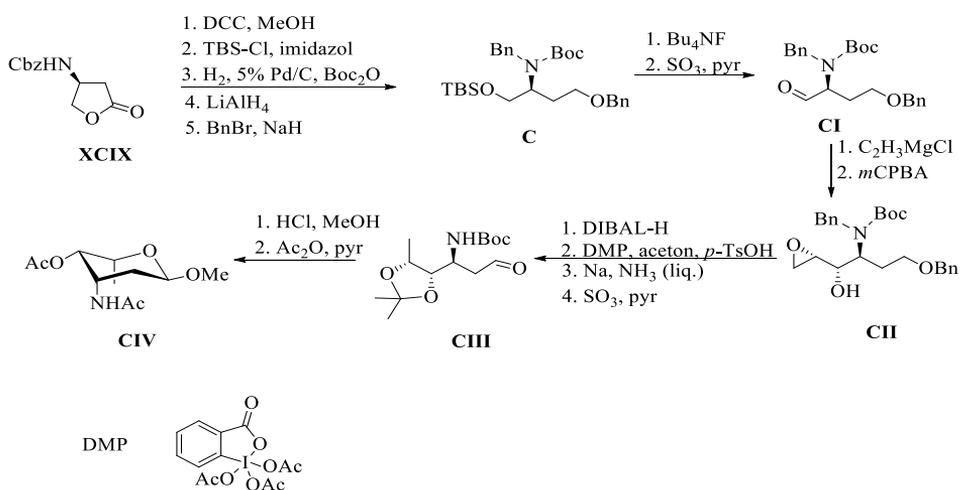
W kolejnej syntezie *N*-benzoilo-L-akozaminy wykorzystano reakcję addycji (*S*)-mleczanu etylu (**XCI**) do eteru etylowowinylowego. Reakcja redukcji grupy etoksykarbonylowej, a następnie utlenienia doprowadziły do otrzymania aldehydu **XCII**. Związek ten poddano reakcji sprzęgania z 2-hydrokso-2-cyanopropanem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





Schemat 39. Synteza L-akozaminy z α -hydroksyestru.

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

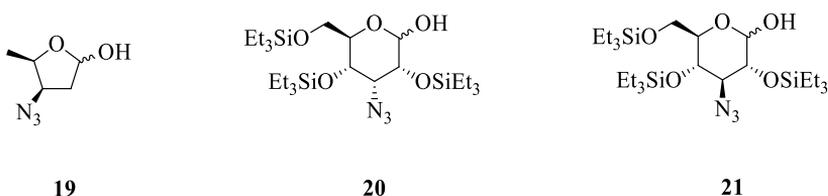


Schemat 40. Totalna synteza L-daunozaminy z pochodnej β -aminolaktonu.



3.2. Synteza pochodnych cukrowych

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



Rysunek 11.

3.2.1. Synteza 3-azydo-3-deoksycukrów

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

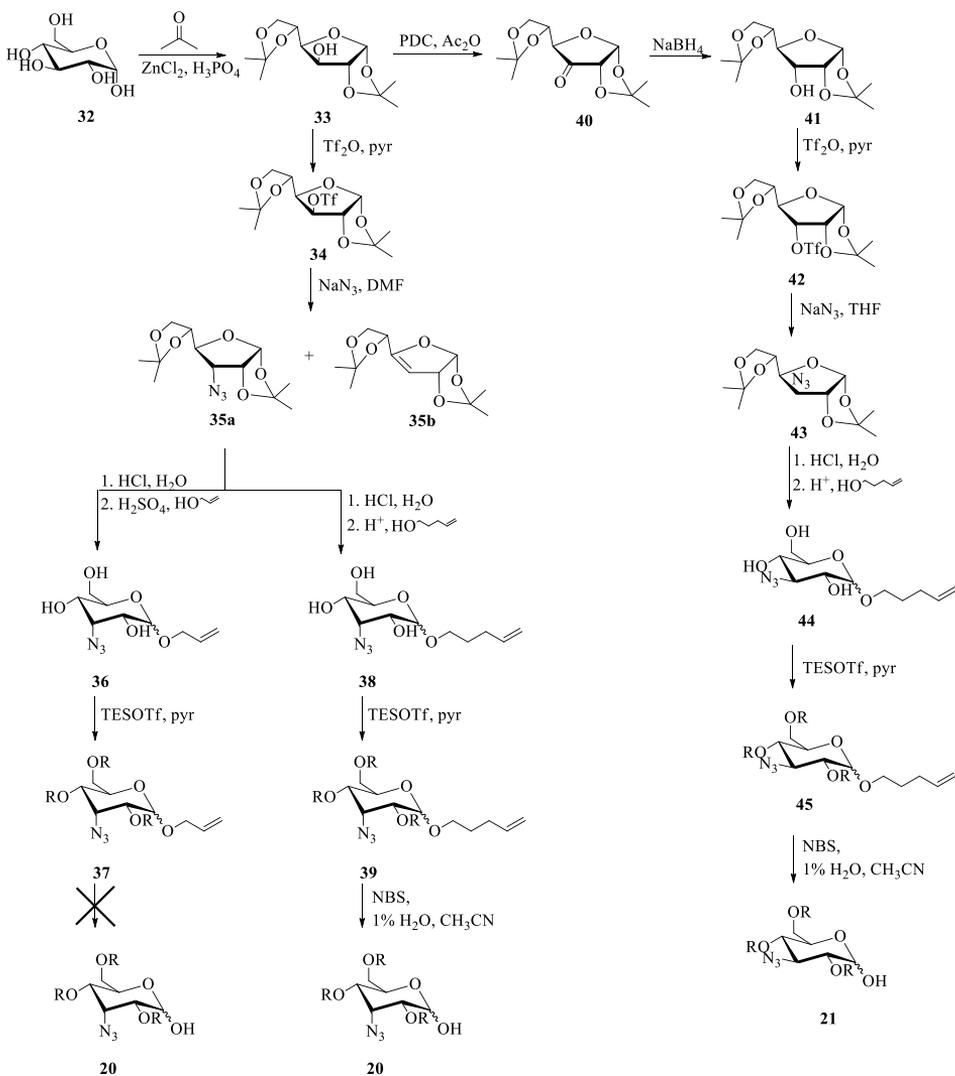
3.2.1.1. Synteza 3-azydo-2,3,5-trideoksyksozy

Dotychczas nie opisano w literaturze otrzymywania 3-azydo-2,3,5-trideoksyksozy z 2-deoksy-D-rybozy. Cząsteczka 2-deoksy-D-rybozy charakteryzuje się małą liczbą podstawników w porównaniu z innymi cukrami, więc wydawało się, że modyfikacja jej struktury powinna być stosunkowo prosta w wykonaniu. Aby przekształcić ją w 3-azydo-2,3,5-trideoksy-D-ksylozę, prekursora odpowiedniego aminocukru i substratu w reakcji glikozydowania aglikonem makrolidu polienowego, przeprowadziłam ciąg reakcji



3.2.1.2. Synteza 3-azydo-3-deoksyheksoz

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

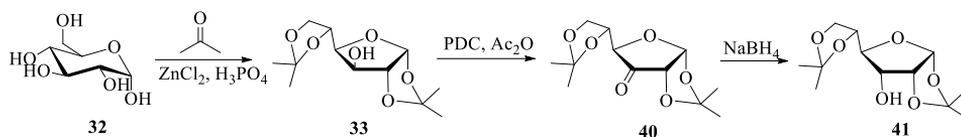


Schemat 42. Synteza pochodnych: 3-azydo-3-deoksy-D-allozy **20** oraz 3-azydo-3-deoksy-D-glukozy **21**.

Wspólnym substratem, który wykorzystałam do syntezy chronionych: 3-azydo-3-deoksy-D-allozy **20** oraz 3-azydo-3-deoksy-D-glukozy **21**, była D-glukoza **32**. W reakcji glukozy z acetonem w środowisku kwaśnym otrzymałam glukofuranozę **33**, w której grupy hydroksylowe znajdujące się na atomach węgla C1, C2 oraz C5, C6 są zablokowane osłonami izopropylidenowymi typu acetalowego. Tak ochroniona pochodna **33** posiada tylko jedną wolną, reaktywną grupę hydroksylową na atomie węgla C3. Dzięki temu zabiegowi mogłam

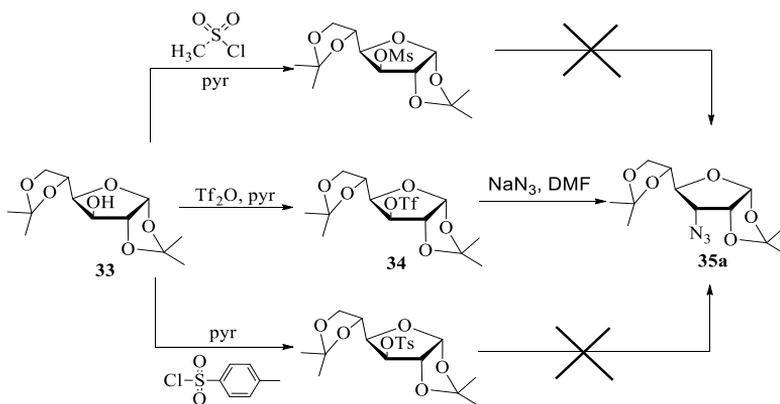


selektywnie przeprowadzać kolejne reakcje. W oparciu o literaturę^{169,170} przeprowadziłam izomeryzację na atomie węgla C3, która polegała na utlenieniu tej grupy hydroksylowej za pomocą PDC, a następnie stereoselektywnej, z uwagi na ograniczenia przestrzenne, redukcji grupy karbonylowej do hydroksylowej przy użyciu borowodorku sodu. (**Schemat 42a**)



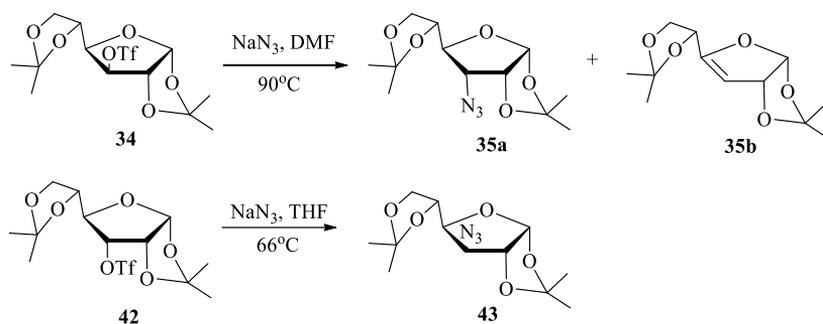
Schemat 42a.

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



Schemat 42b.

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

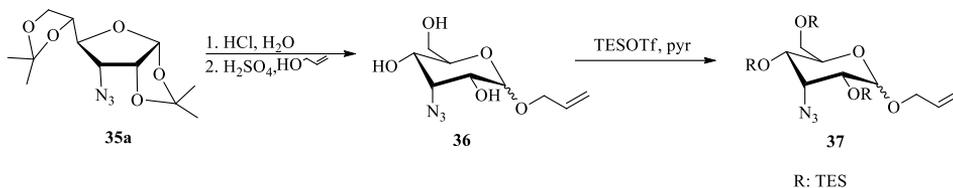


Schemat 42c.

Aby cząsteczki azydocukrów mogły być substratami w reakcji dehydracyjnej glikozylacji z aglikonem AmB **9** musiałam wymienić w nich ochrony grup hydroksylowych poza anomeryczną, która powinna pozostać wolna. Zmiana ugrupowań izopropylidenowych na silylowe wymagała chwilowej ochrony grupy hydroksylowej znajdującej się na atomie węgla C1. Początkowo postanowiłam zablokować ją przy pomocy glikozydu allilowego, który następnie mogłabym selektywnie usunąć w obecności grup *O*-trietylosilylowych znajdujących się na atomach węgla C2, C4 oraz C6. Po usunięciu grup izopropylidenowych rozcieńczonym kwasem solnym otrzymywałam glikozyd allilowy **36** w wyniku działania na cukier alkoholem allilowym wobec H₂SO₄. Następnie związek **36** poddawałam reakcji z trifluorometanosulfonianem



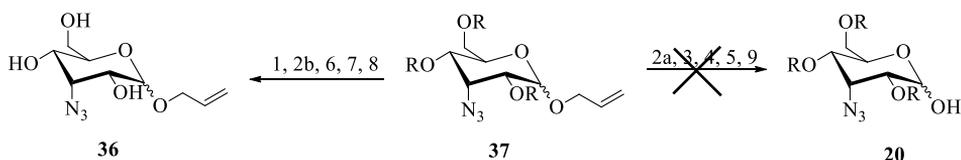
trietylosililu w obecności pirydyny otrzymując całkowicie chronioną pochodną 3-azydo-3-deoksy-D-allozy **37** (Schemat 42d).



Schemat 42d.

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

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



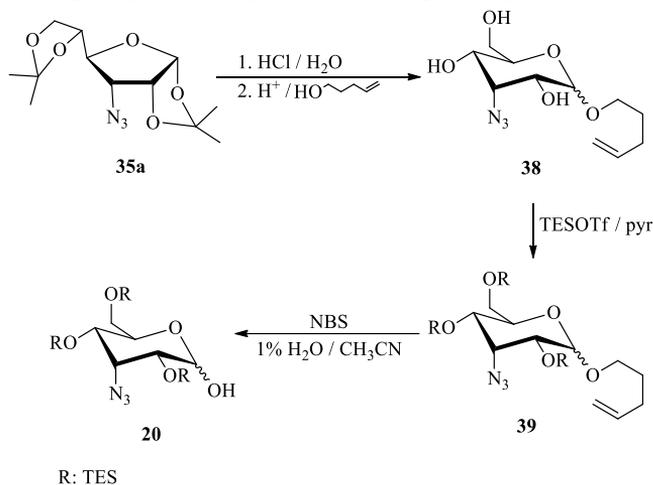
R: SiEt₃

- 1) PdCl₂/MeOH/DCM,
- 2) a) PdCl₄/DCM/DIPEA lub b) DCM/MeOH
- 3) PdCl₂(Ph₃P)₂/DCM/DIPEA
- 4) PdCl₂(Ph₃P)₂ + Ph₃P/DCM/DIPEA
- 5) Pd(Ph₃P)₄/DCM/DIPEA
- 6) Pd(Ph₃P)₄/MeOH/DCM/DIPEA
- 7) Pd(Ph₃P)₄/MeOH/DCM/kropla AcOH
- 8) Pd(Ph₃P)₄/DIPEA/DCM/MeOH
- 9) NBS/1% aq. acetonitryl

Schemat 42e.



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



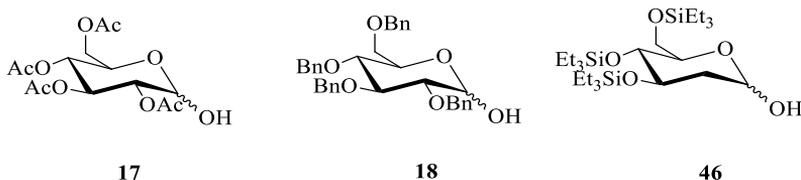
Schemat 42f.

3.2.2. Synteza pochodnych glukozy

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



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



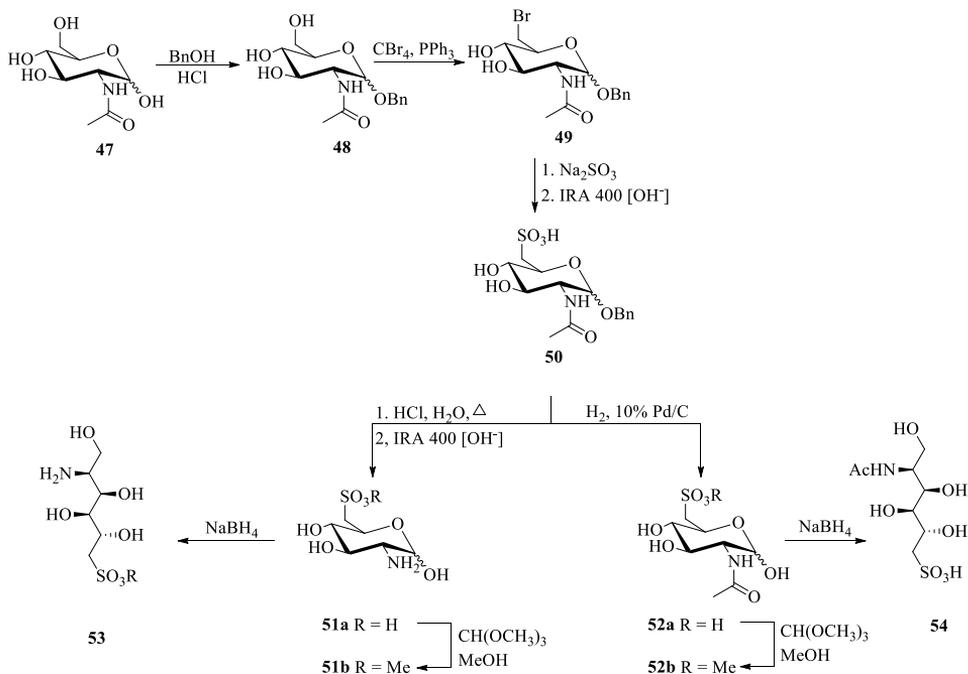
Rysunek 12.

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

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

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

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



Schemat 41. Synteza pochodnych kwasu sulfonowego.

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



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

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

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

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

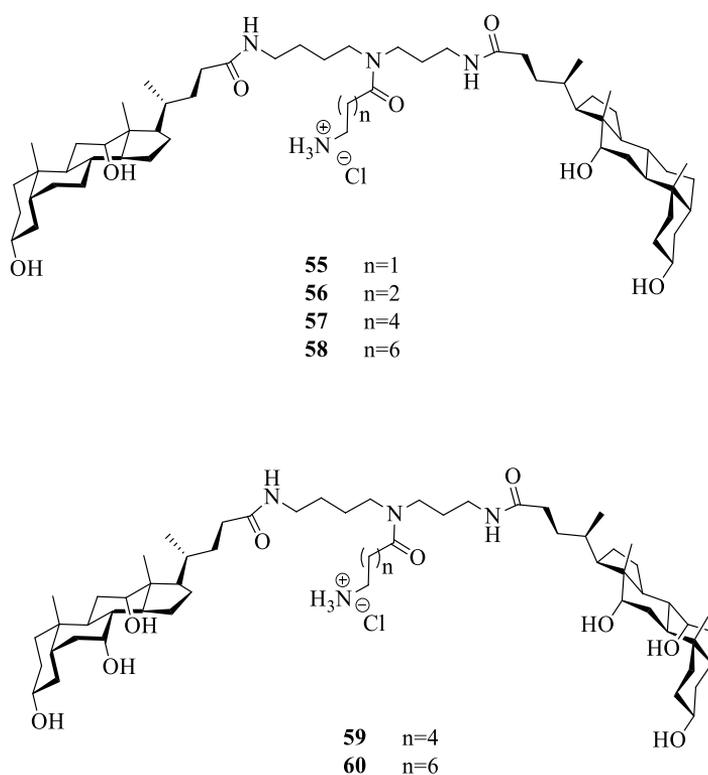
Związek	Wartość MIC (mg ml ⁻¹)							
	Szczyepy bakterii				Szczyepy grzybów			
	SA	SE	EC	PA	CAL	CG	CK	CAR
51a	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	2.0	1.0	0.5
51b	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0
52a	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	0.25	0.25	0.25
52b	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0
53	0.25	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5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

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



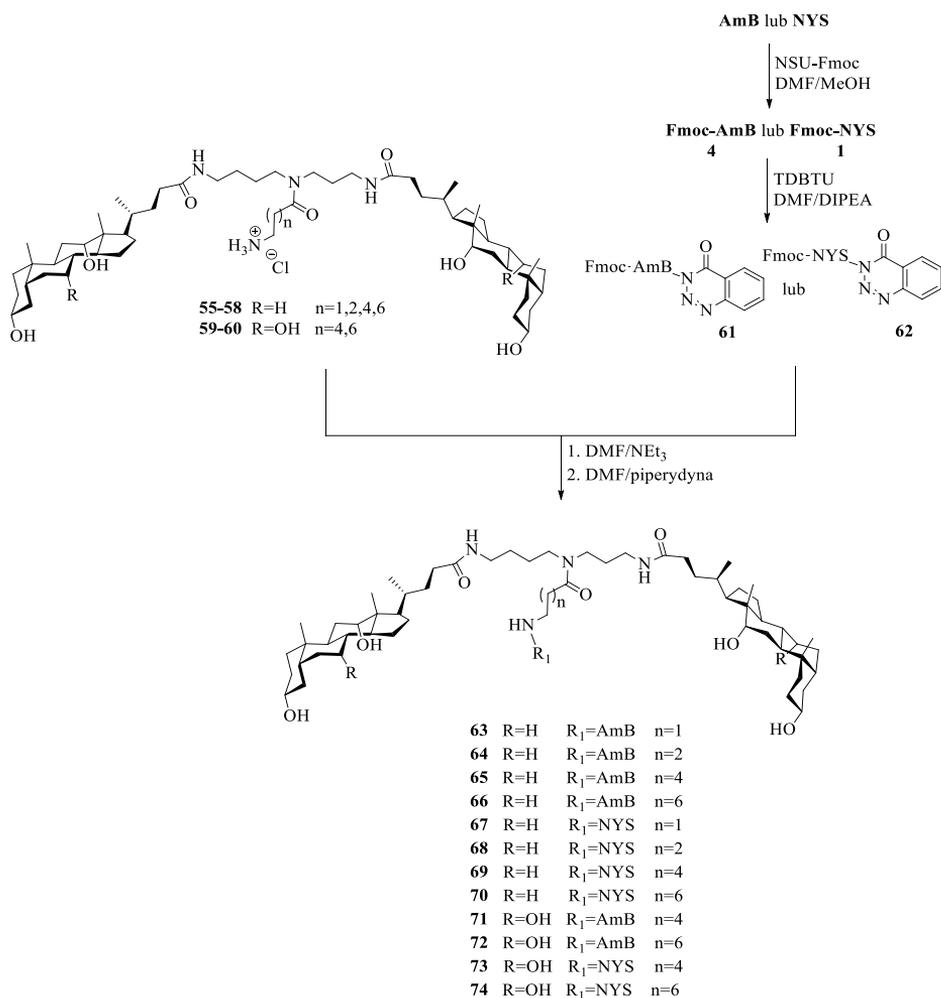
4. Synteza koniugatów makrolidów polienowych z nanoosinikami

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



Rysunek 13.





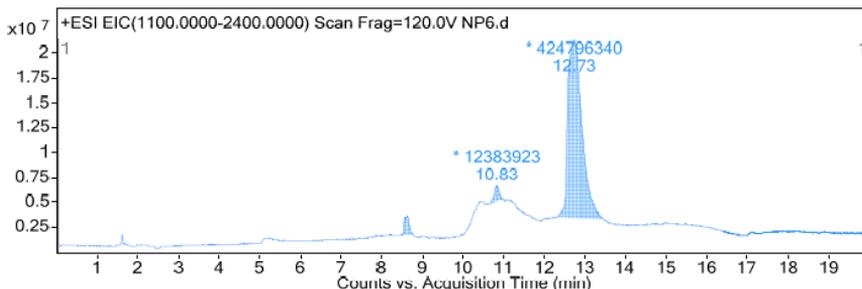
Schemat 44.

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

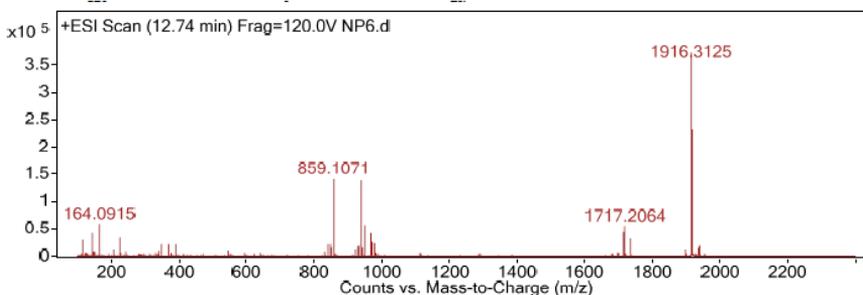


aktywnego przy użyciu TDBTU [tetrafluoroboran *N,N,N,N'*-tetrametylo-*O*-(3,4-dihydro-4-okso-1,2,3-benzotriazyn-3-yl)uroniowy] w środowisku zasadowym prowadziła do otrzymania pożądaných produktów.

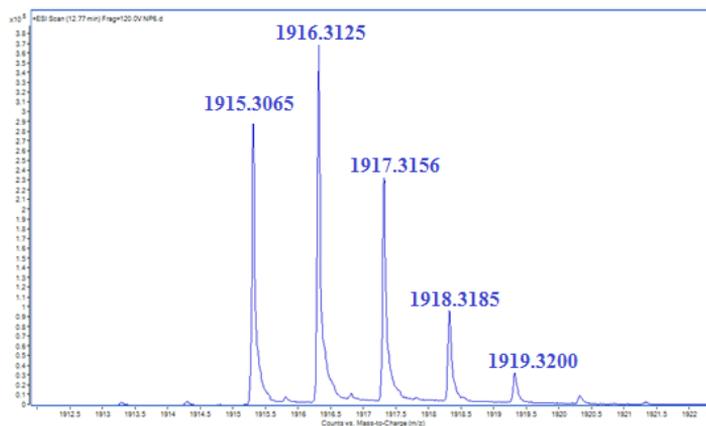
A)



B)



C)



Rysunek 14. Chromatogram ESI-MS przykładowego związku **69** – koniugatu nystatyny A_1 z 'parasolem molekularnym' pochodną kwasu deoksycholowego i łącznikiem 6-aminoheksanoilowym; A) – chromatogram HPLC; B) – widmo mas pomierzone dla głównego pikę o czasie retencji 12.73 min; C) – obraz wiązki zawierającej pozorny pik molekularny $[M+1]$ w widmie mas związku **69** o masie 1914.2991

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

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

4.1. Wyniki badań biologicznych

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

Wszystkie koniugaty **63-74** zostały przetestowane pod kątem aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* na szczepie *C. albicans* SC 5314 i pożywce RPMI-1640, dla których określono wartości MIC₈₀. W warunkach przeprowadzania testów (inkubacja przez 24 godziny w 37 °C w pożywce RPMI-1640 buforowanej do pH 7.0) nie obserwowano tworzenia się izo-nystatyny – kontrola HPLC. Ponadto te same związki zostały przetestowane także pod kątem aktywności hemolitycznej wobec ludzkich erytrocytów, a wartość EH₅₀ określono jako miarę tej aktywności. Indeks selektywnej toksyczności zdefiniowano jako EH₅₀ [μM] / MIC₈₀ [μM] (Tabela 3). Wszystkie koniugaty **63-74** wykazywały niższą aktywność przeciw szczepowi *Candida* niż związki wyjściowe – amfoterycyna B i nystatyna A₁. Najniższą różnicę pomiędzy wartościami MIC₈₀



stwierdzono w przypadku koniugatów **66**, **71** i **72**. Pod względem stężeń molowych MIC tych związków były prawie takie same, jak w przypadku macierzystego antybiotyku. Co ciekawe, w przypadku koniugatów makrolidów polienowych z parasolami molekularnymi na bazie kwasu deoksycholowego (**63-66**), długość łącznika ω -aminokwasowego określa aktywność przeciwgrzybową. Koniugaty z krótkimi łącznikami **63** (n = 1), **64** (n = 2), wykazały znacznie niższą aktywność niż ich odpowiedniki z dłuższymi łącznikami – **65** (n = 4) i **66** (n = 6). Natomiast koniugaty z parasolami molekularnymi na bazie kwasu cholowego **71** (n = 4) i **72** (n = 6) wykazywały podobne działanie przeciwgrzybowe do substancji referencyjnej. Wszystkie koniugaty nystatyny A₁ były zdecydowanie mniej aktywne niż sama NYS A₁, a MIC₈₀ najbardziej aktywnego koniugatu **68** (n = 2) był prawie dziewięciokrotnie wyższy niż NYS A₁.

Tabela 3. Aktywność przeciwgrzybowa oraz hemolityczna dla AmB, nystatyny oraz ich koniugatów z ‘parasolami molekularnymi’.

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

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

Paradoksalnie, najniższą aktywność stwierdzono dla koniugatu NYS **74**, który jest odpowiednikiem najbardziej aktywnego koniugatu AmB **72**. Stwierdzono jakościową różnicę między czynnościami hemolitycznymi koniugatów AmB i NYS A₁. Te pierwsze były mniej hemolityczne niż AmB, podczas gdy wartości EH₅₀ tych drugich były niższe niż NYS A₁. Indeks



selektywnej toksyczności trzech koniugatów AmB **66**, **71** i **72** był lepszy niż dla AmB, podczas gdy dla większości pochodnych nystatyny A₁ wartości EH₅₀ były niższe niż MIC₈₀, czego konsekwencją jest niższa selektywna toksyczność wszystkich koniugatów NYS A₁ niż samej substancji referencyjnej.

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

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

	MIC ₅₀ [µg ml ⁻¹]				
	AmB	66	72	NYS	68
<i>C. albicans ATCC 10231</i>	0.3	0.7	0.25	0.7	12
<i>C. albicans B3</i>	0.3	0.8	0.4	1.0	13
<i>C. albicans B4</i>	0.4	2.3	1.3	1.2	10
<i>C. glabrata</i>	0.3	2.7	1.3	0.45	16
<i>C. krusei</i>	0.5	3.0	1.5	0.9	17
<i>C. parapsilosis</i>	0.6	0.7	1.7	1.1	15
<i>C. tropicalis</i>	0.4	12.5	24	0.8	3.4
<i>S. cerevisiae</i>	0.2	0.75	0.6	0.7	3.0
	MIC ₈₀ [µg ml ⁻¹]				
	AmB	66	72	NYS	68
<i>C. albicans ATCC 10231</i>	0.4	0.8	0.5	1.0	15
<i>C. albicans B3</i>	0.5	0.9	0.75	1.1	15
<i>C. albicans B4</i>	0.5	3.6	1.6	0.9	15
<i>C. glabrata</i>	0.4	3.6	1.7	0.8	22
<i>C. krusei</i>	0.6	3.75	1.8	1.0	31
<i>C. parapsilosis</i>	0.7	1.2	0.9	1.3	16
<i>C. tropicalis</i>	0.5	16	32	1.4	4.0
<i>S. cerevisiae</i>	0.3	0.95	0.8	0.7	3.8



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

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

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

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



5. Podsumowanie i wnioski końcowe

Celem badań, których wyniki opisano w niniejszej rozprawie doktorskiej było zaplanowanie ścieżek syntetycznych oraz otrzymanie pochodnych cukrowych, które posłużyły do zbadania możliwości chemicznych modyfikacji podstawników aminocukrowych w makropierścieniach amfoterycyny B oraz nystatyny A₁.

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

Ponadto zoptymalizowałam metodę syntezy koniugatów amfoterycyny B oraz nystatyny A₁ z ‘parasolami molekularnymi’. Używana procedura obejmowała ochronę grupy aminowej makrolidu polienowego, generowanie estru aktywnego z TDBTU, tworzenie wiązania amidowego z cząsteczką ‘parasola molekularnego’, a następnie usunięcie grupy ochronnej. Zaproponowana ścieżka syntezy tego typu pochodnych jest selektywna i wydajna. Koniugaty makrolidów



polienowych z pochodnymi kwasu doksyholowego oraz połączenia nystatyny A₁ z ‘parasolami molekularnymi’ zostały opisane po raz pierwszy.

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

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



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

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



Część eksperymentalna

1. Aparatura

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

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

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

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

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

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

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

Wywoływacze płytek TLC. Jako wywoływaczy płytek TLC użyto: ninhydrynę, roztwór KMnO_4 , pary jodu oraz roztwory: molibdenowo-cerowy i anyżowy.

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



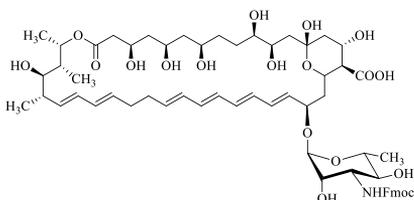
2. Synteza chronionych aglikonów makrolidów polienowych

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

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

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

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

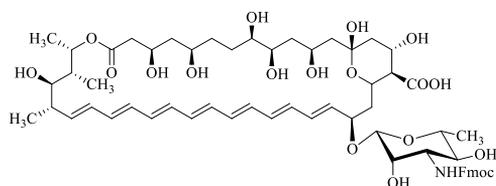


Wychodząc z 100 mg (0.1 mmola) nystatyny A₁ otrzymano 110 mg (0.09 mmol, 92%) oleistego ciała stałego R_f 0.45 (CHCl₃:MeOH:H₂O 4:1:0.1 v/v)

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

¹H NMR (pirydyna-*d*₅) δ [ppm]: 7.83 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.67 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.19 (m, 2H), 6.96 – 5.53 (m, 12H), 4.95 – 3.99 (m, 16H), 3.84 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H), 3.66 – 3.50 (m, 2H), 3.38 – 3.12 (m, 3H), 2.98 – 1.77 (m, 30H), 1.57 – 1.38 (m, 6H), 1.30 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.15 – 1.00 (m, 4H), 0.83 (d, *J* = 13.7 Hz, 3H).

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



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

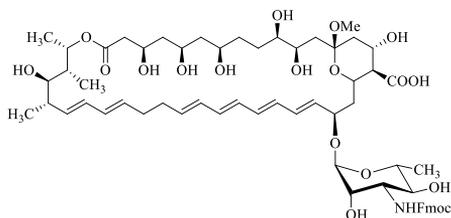
MS-ESI: m/z obliczone dla C₆₂H₈₃NO₁₉: 1145.5559; znalezione 1146.5641 [M+1]⁺.

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

2.2. Ketal metylowy makrolidu polienowego – procedura ogólna

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

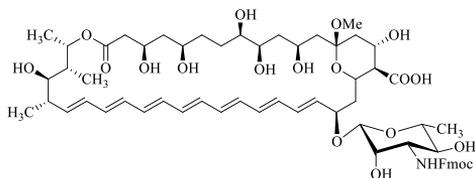
Ketal metylowy nystatyny A₁ (2)



Wychodząc z 140 mg (0.12 mmola) pochodnej Fmoc-NYS **1** otrzymano 107 mg (0.09 mmola, 76%) żółtego, oleistego ciała stałego R_f 0.45 (CHCl_3 :MeOH:H₂O 4:1:0.1 v/v).

¹H NMR (pirydyna-*d*₅) δ [ppm]: 7.83 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.67 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.19 (m, 2H), 6.96 – 5.53 (m, 12H), 4.95 – 3.99 (m, 16H), 3.84 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 3.66 – 3.50 (m, 2H), 3.38 – 3.12 (m, 3H), 3.05 (s, 3H), 2.98 – 1.77 (m, 29H), 1.57 – 1.38 (m, 6H), 1.30 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.15 – 1.00 (m, 4H), 0.83 (d, $J = 13.7$ Hz, 3H).

Ketal metylowy amfoterycyny B (5)



Wychodząc z 100 mg (0.09 mmola) Fmoc-AmB **4** otrzymano 97 mg (0.08 mmola, 96%), R_f 0.45 (CHCl_3 :MeOH:H₂O 4:1:0.1 v/v).

¹H NMR (pirydyna-*d*₅) δ [ppm]: 7.87 – 7.80 (m, 2H), 7.67 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.38 (dt, $J = 12.8$ i 6.3 Hz, 2H), 7.22 (m, 2H), 6.82 – 6.27 (m, 14H), 5.87 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 5.69 (dd, $J = 15.0$ i 9.5 Hz, 1H), 5.53 (dd, $J = 15.1$ i 10.2 Hz, 1H), 5.31 (dd, $J = 21.6$ i 12.1 Hz, 1H), 5.09 (dd, $J = 15.1$ i 7.1 Hz, 1H), 5.03 (m, 1H), 4.95 – 4.87 (m, 1H), 4.76 – 4.68 (m, 2H), 4.57 – 4.48 (m, 4H), 4.31 (dd, $J = 14.4$ i 7.2 Hz, 1H), 4.09 (dd, $J = 17.2$ i 7.7 Hz, 2H), 3.80 – 3.52 (m, 2H), 3.28 (s, 3H), 3.06 – 2.95 (m, 1H), 2.86 – 2.43 (m, 6H), 2.30 – 1.69 (m, 12H), 1.55 (dt, $J = 9.8$ i 4.9 Hz, 3H), 1.49 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.46 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.30 (dt, $J = 10.5$ i 5.2 Hz, 3H).

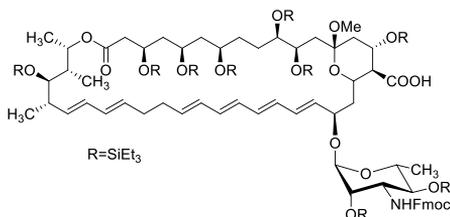
2.3. Eter nonatrietylosililowy makrolidu polienowego – procedura ogólna

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



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

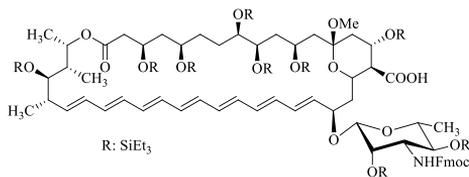
Eter nonatrietylosililowy nystatyny A₁ (3)



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

¹H NMR (pirydyna-*d*₅) δ [ppm]: 7.91 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.77 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.49 – 7.44 (m, 2H), 7.38 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.10 – 6.64 (m, 12H), 5.84 – 5.64 (m, 4H), 5.49 – 5.35 (m, 2H), 4.85 – 4.07 (m, 18H), 3.96 – 3.42 (m, 10H), 2.30 – 1.92 (m, 12H), 1.51 – 0.52 (m, 147H).

Eter nonatrietylosililowy amfoterycyny B (6a)



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

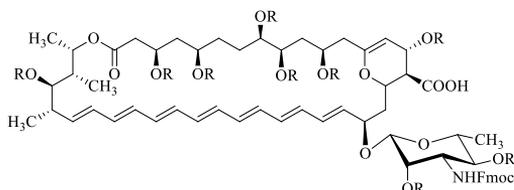
pod zmniejszonym ciśnieniem (6 mmHg) przez 8 h do zestalenia. R_f 0.46 heksan:eter dietylowy (2:1 v/v).

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

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 7.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.60 – 6.01 (m, 12H), 5.80 (dd, *J* = 15.7 i 4.7 Hz, 1H), 5.38 – 5.29 (m, 1H), 5.00 (dd, *J* = 16.7 i 10.9 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.52 – 4.31 (m, 6H), 4.23 (dd, *J* = 13.9 i 7.3 Hz, 2H), 4.08 – 3.80 (m, 4H), 3.73 – 3.39 (m, 3H), 3.28 (tt, *J* = 19.9 i 10.0 Hz, 1H), 3.06 (s, 3H),



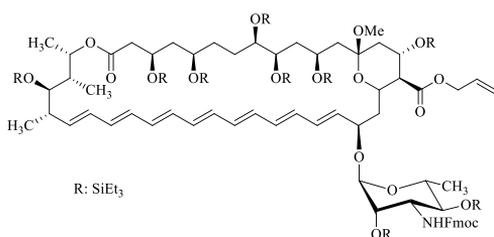
2.58 – 2.37 (m, 3H), 2.31 (dd, $J = 13.8$ i 6.7 Hz, 1H), 2.08 – 1.49 (m, 9H), 1.33 – 1.16 (m, 8H), 1.09 – 0.81 (m, 93H), 0.78 – 0.44 (m, 54H).



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

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 7.79 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 6.60 – 6.01 (m, 12H), 5.80 (dd, $J = 15.7$ i 4.7 Hz, 1H), 5.38 – 5.29 (m, 1H), 5.00 (dd, $J = 16.7$ i 10.9 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.52 – 4.31 (m, 6H), 4.23 (dd, $J = 13.9$ i 7.3 Hz, 2H), 4.08 – 3.80 (m, 4H), 3.73 – 3.39 (m, 3H), 3.28 (tt, $J = 19.9$ i 10.0 Hz, 1H), 2.58 – 2.37 (m, 3H), 2.31 (dd, $J = 13.8$ i 6.7 Hz, 1H), 2.08 – 1.49 (m, 9H), 1.33 – 1.16 (m, 8H), 1.09 – 0.81 (m, 93H), 0.78 – 0.44 (m, 54H).

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



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

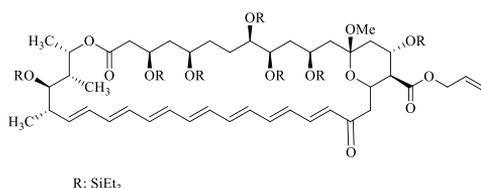
i wdroplono 0.26 ml (3 mmole) bromku allilu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 12 h w temperaturze 5°C . Po upływie tego czasu mieszaninę poreakcyjną wylano na 9 ml roztworu wody i nasyconego roztworu NaHCO_3 (1:1 v/v). Fazę wodną ekstrahowano 4×4 ml eteru dietylowego. Połączone fazy organiczne przemyto 5 ml solanki i suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany surowy olej oczyszczono za pomocą PLC w eluencie heksan:eter dietylowy (10:1 v/v). Oczyszczony związek **7** kilkakrotnie zalano benzenem, co spowodowało jego sproszkowanie. Powstały osad suszono przez 8 h pod zmniejszonym ciśnieniem (6 mm Hg). Otrzymano 110 mg (0.05 mmola, 63%) pochodnej **7** R_f 0.85 (heksan:eter dietylowy 4:1 v/v).

MS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{120}\text{H}_{215}\text{Si}_9\text{NO}_{19}$: 2226.4; znalezione 2249.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 7.79 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 6.57-6.50 (m, 2H) 6.40 – 6.01 (m, 14H), 6.06 – 5.99 (m, 1H) 5.80 (dd, $J = 15.7$ i 4.7 Hz, 1H), 5.38 – 5.29 (m, 1H), 5.00 (dd, $J = 16.7$ i 10.9 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.52 – 4.31 (m, 6H), 4.23 (dd, $J = 13.9$ i 7.3 Hz, 2H), 4.08 – 3.80 (m, 4H), 3.73 – 3.39 (m, 3H), 3.28 (tt, $J = 19.9$ i 10.0 Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 2.58 – 2.37 (m, 3H), 2.31 (dd, $J = 13.8$ i 6.7 Hz, 1H), 2.08 – 1.49 (m, 9H), 1.33 – 1.16 (m, 8H), 1.09 – 0.81 (m, 93H), 0.78 – 0.44 (m, 54H).

2.5. Chroniony heptaenon (8)



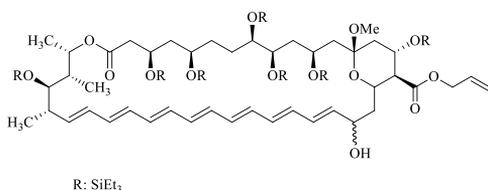
160 mg (0.07 mmola) związku **7** rozpuszczono w 5 ml bezwodnego THF i dodano 234 mg (0.72 mmola) węglału cezu. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 24 mg (0.11 mmola) DDQ i całość mieszano przez 20 minut

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

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 7.79 (dd, $J = 15.7$ i 11.1 Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 21.9$ i 7.5 Hz, 1H), 6.73 (dd, $J = 14.8$ i 9.9 Hz, 1H), 6.57 – 6.46 (m, 2H), 6.38 – 5.92 (m, 10H), 5.39 (dd, $J = 17.2$ i 1.5 Hz, 1H), 5.33 – 5.23 (m, 2H), 4.67 (dd, $J = 5.7$ i 1.3 Hz, 2H), 4.47 (td, $J = 10.5$ i 4.7 Hz, 2H), 4.22 – 4.11 (m, 1H), 4.06 – 3.93 (m, 2H), 3.85 – 3.74 (m, 2H), 3.57 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 3.23 – 3.13 (m, 1H), 2.92 (s, 3H), 2.59 (dd, $J = 17.8$ i 3.7 Hz, 1H), 2.45 – 2.33 (m, 3H), 2.00 – 1.15 (m, 17H), 1.14 – 0.38 (m, 111H).



2.6. Chroniony aglikon amfoterycyny B (9)



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

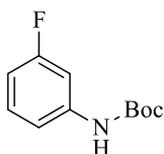
Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 30 minut w temperaturze pokojowej i obserwowano zmianę barwy z czerwonej na żółtą. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną wylano na 5 ml nasyconego roztworu chlorku amonu. Powstałą emulsję rozcieńczono eterem dietylowym (15 ml). Fazę organiczną przemyto 3×8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

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

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6.42 – 5.88 (m, 12H), 5.50 – 5.34 (m, 1H), 5.32 – 5.24 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.72 – 4.52 (m, 3H), 4.30 (m, 2H), 4.03 – 3.87 (m, 6H), 3.77 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 3.61 – 3.44 (m, 2H), 3.08 (m, 3H), 2.54 – 2.36 (m, 3H), 1.97 – 1.41 (m, 3H), 1.37 – 1.13 (m, 17H), 1.08 – 0.45 (m, 11H).

3. Synteza niecukrowych pochodnych

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



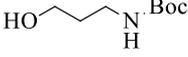
1 g (9 mmoli) *m*-fluoroaniliny rozpuszczono w 10 ml bezwodnego etanolu, a następnie wkroplono roztwór 2.95 g (13.5 mmola) Boc₂O w 10 ml bezwodnego EtOH. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 h. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym w układzie heksan:AcOEt 9:1 v/v. Otrzymano 1.73 g (8 mmoli, 91%) białego osadu **12** o tt 130-132°C R_f 0.64 (heksan:AcOEt 8:2 v/v).

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



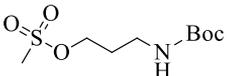
^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 164.44, 152.36, 139.9, 130.00, 113.65, 109.74, 109.53, 105.96, 105.69, 80.97, 28.30.

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

 Do roztworu 1.37 ml (27 mmoli) 3-amino-1-propanolu w 5 ml bezwodnego CH_2Cl_2 , wkroplono roztwór Boc_2O (6.48 g, 30 mmoli) w 15 ml bezwodnego CH_2Cl_2 . Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4 h. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym w układzie heksan:AcOEt 6:4 v/v. Otrzymano 4.1 g (24 mmole, 89%) oleju **13** R_f 0.72 (heksan:AcOEt 6:4 v/v).

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 4.89 (s, 1H), 3.66 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.28 (q, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.16 (s, 1H), 1.67 (quint, $J = 6$ Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).

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

 2 g (12 mmoli) 3-[(*N*-*tert*-butoksykarbonylo)amino]-1-propanolu (**14**) rozpuszczono w 10 ml pirydyny i mieszaninę ochłodzono do 0 °C. Następnie wkroplono 1 ml (13 mmoli) chlorku metanosulfonowego. Reakcję mieszano przez 2 h w temperaturze 0 °C, a następnie w temperaturze pokojowej przez kolejne 2 h. Po zakończeniu reakcji do mieszaniny dodano 50 ml wody i ekstrahowano AcOEt (3x50 ml). Warstwy organiczne połączono, wysuszono siarczanem magnezu, a rozpuszczalnik odparowano. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym w układzie heksan:AcOEt 8:2 v/v. Uzyskano 1.8 g (7 mmoli, 58%) białego osadu **16** o t_f poniżej 30°C; R_f 0.42 (heksan:AcOEt 9:1 v/v).

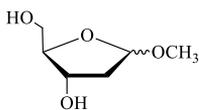
HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{S}$: 253.0984; znalezione 254.1014 $[\text{M}+1]^+$

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 4.78 (s, 1H), 4.30 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.27 (dd, $J = 11.9, 5.9$ Hz, 2H), 3.04 (s, 3H), 1.95 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 155.98, 67.41, 52.56, 37.38, 28.38, 27.41, 8.61

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

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



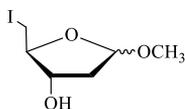
W kolbie zabezpieczonej przed dostępem wilgoci ochłodzono do 0 °C 100 ml bezwodnego metanolu, a następnie wdroplono 10 ml chlorku acetylu. Tę mieszaninę reakcyjną mieszano przez 10 minut w łaźni lodowej, a następnie przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie kolbę z mieszaniną reakcyjną pozostawiono w temperaturze -20 °C przez kolejne 30 minut. Po upływie tego czasu dodano 3 g (37.3 mmola) 2-deoksy-D-rybozy w jednej porcji i mieszano w temperaturze pokojowej do momentu rozpuszczenia się cukru, po czym pozostawiono mieszaninę reakcyjną w temperaturze -20 °C przez 18 h. Po zakończeniu reakcji do mieszaniny poreakcyjnej dodano nasyconego roztworu Na₂CO₃ do momentu uzyskania odczynu obojętnego. Stałe sole nieorganiczne odsączono, a przesącz oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 40 ml AcOEt i przemyto wodą, aby oddzielić sole nieorganiczne. Otrzymano 3.3 g (37.3 mmola, 100%) oleju **27**. R_f 0.7 (AcOEt:heksan 1:1 v/v), [α]_D²⁵ +35 (c1, CHCl₃).

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

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

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

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.



1 g (6.75 mmola) substratu **27** rozpuszczono w mieszaninie bezwodnego toluenu (10 ml) i acetonitrylu (20 ml). Następnie do roztworu dodano 2.6 g (10 mmoli) PPh₃, 0.74 ml (13.5 mmola) imidazolu i porcjami 1.27 g (10 mmola) jodu. Po dodaniu ostatniej porcji jodu mieszaninę reakcyjną ogrzewano do wrzenia przez 3 h do zaniku substratu (kontrola za pomocą TLC). Po zakończeniu reakcji i ochłodzeniu mieszaniny poreakcyjnej do temperatury pokojowej dodano 200 ml eteru dietylowego, a wytrącony osad przesączono przez Celit, przemywając go kilkakrotnie eterem dietylowym oraz chloroformem. Przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczano za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym; stosując jako eluent

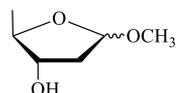


mieszaninę heksan:AcOEt 6:4 v/v. Otrzymano 1 g (3.8 mmola, 57%) oleju **28**, R_f 0.47 (heksan:AcOEt 1:1 v/v), $[\alpha]_D^{25} +20$ (c1, CHCl₃).

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

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

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



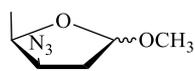
950 mg (3.68 mmola) substratu **28** rozpuszczono w 5 ml bezwodnego etanolu, dodano 1.75 ml (9.94 mmola) DIPEA, a następnie 103 mg (0.74 mmola) Pd(OH)₂ i przepuszczano gazowy wodór. Po dwóch dniach, mieszaninę poreakcyjną przesączono przez Celit, który następnie przemyto kilkakrotnie etanolem. Przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość zadano CCl₄ i odsączono wytrącony biały osad. Przesącz ponownie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 382 mg (2.89 mmola, 79%) produktu **29** będącego mieszaniną dwóch anomerów α i β w stosunku 1:1, R_f 0.32 (heksan:AcOEt 1:1 v/v).

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

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

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

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.



0.5 g (3.78 mmola) związku **29** rozpuszczono w 20 ml bezwodnego dichlorometanu. Roztwór ochłodzono do -60 °C intensywnie mieszając, a następnie dodano 0.6 ml (7.56 mmola) pirydyny i wkroplono powoli 0.95 ml (5.67 mmola) Tf₂O. Po zakończeniu wkraplania bezwodnika mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury 0 °C przez 2 h, a następnie rozcieńczono zawartość kolby 50 ml chloroformu i 50 ml 2N HCl. Warstwę organiczną oddzielono, przemyto wodą, wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość zawierającą pochodną **30** rozpuszczono w 10 ml DMF, dodano 740 mg (11.34 mmola) azydku sodu i powstałą zawiesinę mieszano w temperaturze

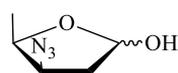


pokojoyej przez 2 h. Po zakończeniu reakcji odsączono nadmiar azydku sodu, roztwór zatężono, a pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym w eluencie heksan:eter dietylowy 2:1 v/v. Otrzymano 290 mg produktu **31** (1.84 mmola, 49% po dwóch etapach), który udało rozdzielić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

Anomer α : $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 5.12 (dd, $J = 5.7$ i 3.1 Hz, 1H), 4.21 (qt, $J = 9.7$ i 4.9 Hz, 1H), 3.92 (ddd, $J = 6.6$ i 4.1 i 2.4 Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 2.36 (ddd, $J = 14.7$; 5.7 i 2.4 Hz, 1H), 2.25 (ddd, $J = 14.7$ i 6.7 i 3.1 Hz, 1H), 1.36 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H).

Anomer β : $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 5.01 (dd, $J = 5.8$ i 1.5 Hz, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.98 (ddd, $J = 7.2$; 5.1 i 2.3 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.38 (ddd, $J = 14.3$; 7.0 i 5.9 Hz, 1H), 2.18 (m, 1H), 1.39 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H).

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



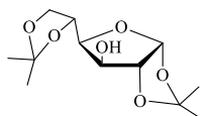
50 mg (0.32 mmola) związku **31** rozpuszczono w 2 ml 80% kwasu octowego. Następnie roztwór ogrzano do temperatury 60°C , którą utrzymywano przez 30 minut. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej, oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono za pomocą PLC w układzie heksan:AcOEt (7:3 v/v). Otrzymano 30 mg (0.21 mmola, 67%) produktu **19**, który był mieszaniną dwóch anomerów oraz formy liniowej.

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3$: 143.0695; znalezione 144.0489 $[\text{M}+1]^+$

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 5.66 (dd, $J = 5.3$ i 3.3 Hz, 1H), 5.41 (t, $J = 6.6$ Hz, 0.4H), 4.38 (qd, $J = 6.3$, 4.3 Hz, 1H), 4.18 – 4.09 (m, 0.4H), 4.04 – 3.91 (m, 2H), 2.43 – 2.14 (m, 3H), 1.43 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 1.33 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H).

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

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

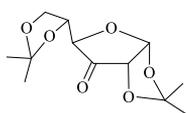


Związek **33** otrzymano wg lit.¹⁸⁷ jako biały bezpostaciowy osad o tt 106.2 - 107.8 $^\circ\text{C}$ (heksan); $[\alpha]_D^{25}$ -12 (c 1, CHCl_3)

lit. tt 106 - 7 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25}$ -12 (c 1, CHCl_3)¹⁸⁷



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

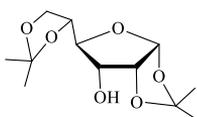


Związek **40** otrzymano wg lit.¹⁷⁰ Produkt izolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan:AcOEt 1:1 v/v. Otrzymano białe kryształy o *t*_m 99.8-101.8 °C (AcOEt/heksan); $[\alpha]_D^{25} +35$ (*c*1, CHCl₃); *R*_f 0.57 (AcOEt/heksan 1:1 v/v).

lit. *t*_m 127-9 °C, wyd. 94%,¹⁷⁰ *t*_m 108-112 °C, $[\alpha]_D^{25} +40$ (*c*2, CHCl₃)¹⁶⁹

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

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



Związek **41** otrzymano wg lit.¹⁷⁰ W wyniku redukcji powstają dwa produkty, które rozdzielono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan/octan etylu 2:1 v/v. Po krystalizacji z CHCl₃/heksan; otrzymano białe kryształy o *t*_m 73.1-74.9 °C, $[\alpha]_D^{25} +38$ (*c*1, CHCl₃), *R*_f 0.45 (AcOEt/heksan 1:1 v/v). lit. olej¹⁶⁹

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

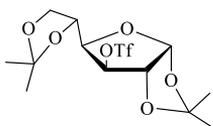
5.4. 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-*O*-trifluorometanosulfonylo- α -D-furanoza – procedura ogólna

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.

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



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



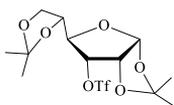
Wychodząc z 1.34 g (5.15 mmola) substratu **33** otrzymano 1.92 g produktu **34** (4.8 mmola, 95%) o *tt* 69.8-71.4 °C, $[\alpha]_D^{25}$ -43 (c1, CHCl₃); *R_f* 0.58 heksan:eter dietylowy (2:1 v/v).

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

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

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

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

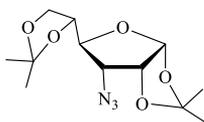


Wychodząc z 2 g (7.7 mmola) 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno- α -D-allofuranozy (**41**) otrzymano produkt **42** w postaci oleju (2.55 g, 6.5 mmola, 85%), *R_f* 0.42 (heksan:Et₂O 2:1 v/v)

HRMS-ESI: *m/z* obliczone dla C₁₃H₁₉F₃SO₈: 392.0753; znalezione 393.0387 [M+1]⁺

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

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



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

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

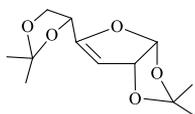


stacjonarną stanowił żel krzemionkowy, zaś jako eluent zastosowano heksan – produkt opuszczał kolumnę jako drugi. Uzyskano 1.2 g (4.2 mmola, 60%) produktu **35a** w postaci zestalającego się oleju; $[\alpha]_D^{25} +59$ (c1, CHCl₃)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₁₂H₁₉N₃O₅: 285.1325; znalezione 258.1403 [M-N₂+1]⁺

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

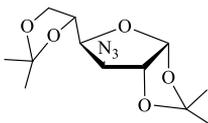
¹³C NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 113.25, 110.09, 103.94, 80.57, 78.06, 77.23, 75.77, 66.76, 62.61, 26.50, 26.44, 26.28, 25.07.



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

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

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



1.9 g (4.8 mmola) pochodnej triflatowej **42** rozpuszczono w mieszaninie tetrahydrofuranu (30 ml) i wody (2 ml), a następnie dodano 2.5 g (38.7 mmola) azydku sodu. Zawiesinę ogrzewano przez 24 h. Po zakończeniu reakcji produkt izolowano w analogiczny sposób jak związek **34**. Produkt **43** oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, jako eluent stosując heksan. Otrzymano 990 mg (3.5 mmola, 70%) oleju **43**, o $[\alpha]_D^{25} -37$ (c1, CHCl₃); R_f 0.39 w układzie heksan:eter dietylowy 2:1 v/v. lit. $[\alpha]_D^{25} -36$ (c0.65, CHCl₃);¹⁷¹ olej.¹⁷⁰

HRMS-ESI: m/z obliczone dla C₁₂H₁₉N₃O₅: 285.1325, znalezione 258.1623 [M-N₂+1]⁺

IR $\nu_{N=N=N}$ 2100 cm⁻¹ (lit. IR KBr $\nu_{N=N=N}$ 2100 cm⁻¹)¹⁷¹

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

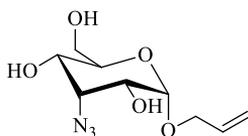


^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 112.27, 109.54, 105.03, 83.40, 80.47, 77.27, 73.03, 67.63, 66.34, 26.85, 26.63, 26.17, 25.14.

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

4.4 mmole 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-furanozy rozpuszczono w 12.5 ml H_2O oraz 1.25 ml stęż. HCl i termostatowano w temperaturze 60 °C przez 2 h. Po tym czasie rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości – zestalającego się oleju dodano 7 ml alkoholu allilowego oraz 0.09 ml stęż. H_2SO_4 . Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 100 °C przez około 2.5 h. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano 13.5 mg (0.09 mmola) stałego K_2CO_3 , a następnie oddestylowano nadmiar alkoholu pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej. Fazę stacjonarną stanowił żel krzemionkowy, zaś jako eluent zastosowano chloroform, a następnie chloroform:metanol (10:1 v/v).

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

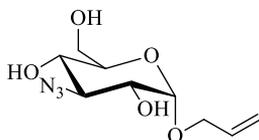


Z 1.25 g (4.4 mmola) 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-allofuranozy (**35a**) otrzymano 539 mg (2.2 mmola, 50%) anomeru α produktu **36** $[\alpha]_D^{25}$ -6 (*c*1.5, MeOH)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$: 245.1012, znalezione 244.0961 [$\text{M}-1$]⁻

^1H NMR (MeOH-*d*₄) δ [ppm]: 6.04 – 5.90 (m, 1H), 5.38 – 5.28 (m, 1H), 5.20 – 5.14 (m, 1H), 4.57 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.43 – 4.32 (m, 1H), 4.14 – 4.10 (m, 1H), 4.08 – 4.05 (m, 1H), 3.83 (dt, $J = 5.6$ i 2.8 Hz, 1H), 3.72 – 3.62 (m, 2H), 3.51 (dd, $J = 7.9$ i 3.5 Hz, 1H), 2.03 (s, 1H).

3-azydo-3-deoksy- α -D-glukopiranozyd allilu



Z 500 mg (1.75 mmola) 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-allofuranozy otrzymano 216 mg (0.87 mmola, 50%) 3-azydo-3-deoksy- α -D-glukopiranozyd allilu; R_f 0.55 (CHCl_3 :MeOH 8:1 v/v)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$: 245.1012; znalezione 246.1138 [$\text{M}+1$]⁺



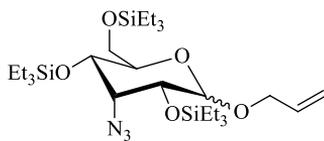
^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 6.04 – 5.90 (m, 1H), 5.41 – 5.31 (m, 1H), 5.21 – 5.15 (m, 1H), 4.84 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.26 – 4.22 (m, 1H), 4.14 – 3.98 (m, 2H), 3.80 (dd, $J = 11.8$ i 2.3 Hz, 1H), 3.70 – 3.54 (m, 3H), 3.46 – 3.39 (m, 1H).

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

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.

(1.6 mmola) 3-azydo-3-deoksy-D-piranozydu allilu rozpuszczono w 10 ml bezwodnego CH_2Cl_2 , otrzymaną mieszaninę reakcyjną ochłodzono do 0°C , dodano 0.8 ml (9.6 mmola) pirydyny, a następnie powoli wkroplono 6.4 mmola odczynnika sililującego. Reakcję prowadzono przez 1 h w 0°C , a następnie 1 h w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę wylano na 20 ml nasyconego roztworu NaHCO_3 , powstałe fazy rozdzielono. Fazę organiczną przemyto 10 ml H_2O , a następnie wysuszono nad siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany olej oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent heksan, a następnie mieszaninę heksan:eter dietylowy 2:1 v/v.

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

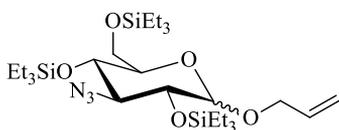


Do 380 mg (1.6 mmola) 3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozydu allilu **36** użyto 1.2 ml (6.4 mmola) TESOTF i otrzymano 580 mg (0.98 mmol, 61%) produktu **37** w postaci oleju R_f 0.94 (heksan:eter dietylowy 5:1 v/v).

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 6.03 – 5.83 (m, 1H), 5.29 (ddd, $J = 17.2$ i 3.3 i 1.6 Hz, 1H), 5.22 – 5.12 (m, 1H), 4.55 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.33 (ddt, $J = 12.5$ i 5.4 i 1.5 Hz, 1H), 4.07 (ddt, $J = 12.5$ i 6.1 i 1.3 Hz, 1H), 3.89 – 3.81 (m, 2H), 3.74 (m, 2H), 3.60 – 3.53 (m, 2H), 0.99 (m, 27H), 0.73 – 0.53 (m, 18H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 134.32, 116.99, 99.55, 74.50, 72.03, 70.02, 68.43, 67.60, 62.15, 6.73, 4.79, 4.52.

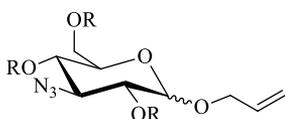
2,4,6-tri-*O*-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-glukopiranozyd allilu



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

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 5.91 – 5.78 (m, 1H), 5.12 – 5.08 (m, 1H), 5.04 – 4.96 (m, 1H), 4.69 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J = 7.0$ i 5.1 Hz, 1H), 3.93 – 3.16 (m, 7H), 1.07 – 0.91 (m, 27H), 0.79 – 0.54 (m, 18H).

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



R: TBS

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

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{27}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}_3$: 587.3606; znalezione 588.3495 $[\text{M}+1]^+$

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 6.00 – 5.87 (m, 1H), 5.38 – 5.30 (m, 1H), 5.25 – 5.20 (m, 1H), 4.75 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.26 – 4.18 (m, 1H), 4.05 – 3.99 (m, 1H), 3.88 (dd, $J = 10.4, 4.8$ Hz, 1H), 3.80 – 3.66 (m, 2H), 3.54 (dd, $J = 9.9, 3.5$ Hz, 1H), 3.45 – 3.38 (m, 1H), 3.13 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 0.92 (s, 27H), 0.12 (d, $J = 1.4$ Hz, 18H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 133.66, 118.05, 97.33, 72.28, 71.52, 70.12, 68.57, 66.95, 64.49, 25.88, 25.70, 25.65, 18.30, 18.06, 17.98, -3.57, -4.68, -4.89, -5.45, -5.49.

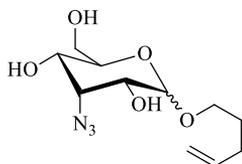
5.9. 3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd 4-pentenylu – procedura ogólna

Do 3.15 mmola 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-furanozy dodano 9 ml H_2O oraz 0.9 ml stęż. HCl i termostatowano w temperaturze 60 °C przez 2 h, a następnie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 3 mmole (97%) zestalającego się oleju, do którego dodano 4 ml (39 mmoli) 4-penten-1-olu oraz 7 mg (0.03 mmola) kwasu kamforosulfonowego. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 100 °C przez około 18 h. Po tym czasie dodano kilka kropel trietyloaminy, a następnie



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

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

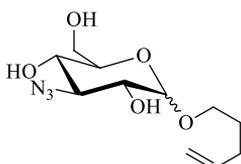


Wychodząc z 900 mg (3.15 mmola) 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-allofuranozy otrzymano 413 mg (1.5 mmola, 50%) anomeru α związku **38**.

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

1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 5.93 – 5.72 (m, 1H), 5.11 – 4.97 (m, 2H), 4.63 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.27 (t, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J = 7.3$ i 4.0 Hz, 1H), 3.98 – 3.66 (m, 5H), 3.64 – 3.53 (m, 1H), 2.59 (bs, 3H), 2.26 – 2.06 (m, 2H), 1.80 – 1.61 (m, 2H).

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



Wychodząc z 1.5 g (5.3 mmola) 1,2;5,6-di-*O*-izopropylideno-3-azydo-3-deoksy- α -D-glukofuranozy **43** po dwóch etapach otrzymano 730 mg (2.7 mmola, 51%) produktu **44** będącego mieszaniną anomerów α i β w stosunku 1:1 w postaci oleju R_f 0.55 ($CHCl_3$:MeOH 8:1 v/v).

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

1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 5.84 (ddt, $J = 16.9$ i 10.2 i 6.6 Hz, 2H), 5.13 – 4.97 (m, 4H), 4.87 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H_α), 4.35 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_β), 3.98 – 3.36 (m, 16H), 2.22 – 2.10 (m, 4H), 1.84 – 1.64 (m, 4H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 137.91, 137.76, 115.29, 115.15, 102.90, 97.70, 75.87, 73.15, 71.78, 71.04, 69.78, 69.20, 68.94, 68.20, 67.87, 67.53, 62.14, 62.01, 30.33, 30.11, 28.66, 28.50.

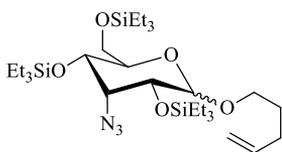


5.10. 2,4,6-tri-*O*-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-piranozyd 4-pentenylu – procedura ogólna

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.

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

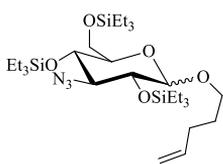
2,4,6-tri-*O*-(trietylosililo)-3-azydo-3-deoksy-D-allopiranozyd 4-pentenylu (39)



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

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

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



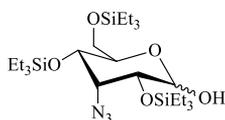
Wychodząc z 166 mg (0.6 mmola) 3-azydo-3-deoksy- α -D-glukopiranozydu 4-pentenylu otrzymano 166 mg (0.3 mmola, 50%) produktu **45** będącego mieszaniną anomerów α i β w stosunku 1:1 produktu w postaci oleju. R_f 0.77 w układzie heksan:octan etylu 40:1 v/v.

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

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

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

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

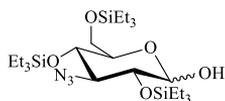


Wychodząc z 500 mg (0.81 mmola) substratu **39** otrzymano 240 mg (0.44 mmola, 54%) produktu w postaci oleju R_f 0.37 heksan:eter dietylowy (15:1 v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{24}H_{53}N_3O_5Si_3$: 547.3293; znalezione 548.3623 $[M+1]^+$

1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 4.90 – 4.86 (m, 1H), 3.94 – 3.81 (m, 3H), 3.78 – 3.63 (m, 3H), 3.48 (dd, $J = 7.5, 3.4$ Hz, 1H), 1.08 – 0.91 (m, 27H), 0.74 – 0.58 (m, 18H).

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



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

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{24}H_{53}N_3O_5Si_3$: 547.3293; znalezione 548.3612 $[M+1]^+$

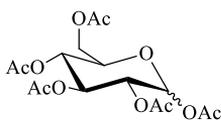
1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 5.12 – 5.08 (m, 1H), 4.69 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.93 – 3.16 (m, 6H), 1.07 – 0.91 (m, 27H), 0.79 – 0.54 (m, 18H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 92.51, 73.08, 72.76, 68.79, 68.14, 61.83, 6.86, 6.74, 6.63, 5.12, 4.79, 4.49.



6. Synteza pochodnych glukozy

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

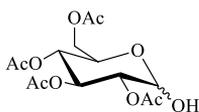


Otrzymano wg lit.¹⁷⁶ Wychodząc z 2 g (11 mmoli) glukozy otrzymano 3 g (7.7 mmola) produktu z wydajnością 69%. Produkt izolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan:AcOEt 7:3 v/v. Otrzymano białe kryształy o tt 107-110°C (AcOEt/heksan); $[\alpha]_D^{25} +105$ (c1, CHCl₃); R_f 0.8 (AcOEt)

lit. tt 110-111°C, $[\alpha]_D^{25} +101.6$ (c0.28, CHCl₃) wyd. 72%¹⁷⁶

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

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

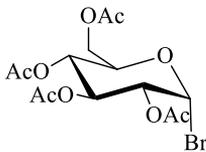


Otrzymano wg lit.¹¹⁷ wychodząc z 2 g (5.1 mmola) 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetylo-D-glukopiranozy otrzymano 1.2 g (3.4 mmola, 71%) produktu w postaci białego osadu. Produkt izolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan:AcOEt 3:1 v/v. R_f 0.42 (heksan:AcOEt 3:1 v/v); wydajność lit. 75%.¹¹⁷

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

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

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



Otrzymano wg lit.¹¹⁶ wychodząc z 6 g (33 mmoli) D-glukozy otrzymano 6 g (14.6 mmola) produktu w postaci białego osadu z wydajnością 44%. Produkt izolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan:AcOEt 4:1 v/v. Otrzymano biały



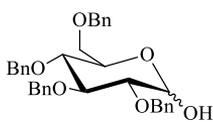
osad o tt 87-88 °C (heksan); $[\alpha]_D^{25} +180$ (c1, CHCl₃); R_f 0.4 (heksan:AcOEt 7:3 v/v).

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

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

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

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

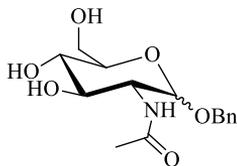


Otrzymano wg lit.^{174,177} wychodząc z 3 g (16.5 mmoli) *D*-glukozy otrzymano 1.3 g (2.4 mmola) produktu w postaci białego osadu **18** o tt 151-152 °C; R_f 0.31 (heksan:AcOEt 7:3 v/v) z wydajnością 15% po trzech etapach. Produkt izolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent: heksan:AcOEt 4:6 v/v.

lit. tt 145-149 °C¹⁷⁷

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

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



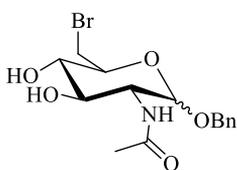
Związek **48** otrzymano wg lit.¹⁸¹ Po dwukrotnej krystalizacji z absolutnego etanolu, otrzymano produkt z wydajnością 54% o tt 179-181 °C, $[\alpha]_D^{25} +134$ (c1, EtOH)

lit. tt 183-184 °C, wyd. 74%, $[\alpha]_D^{25} +104$ (c1, EtOH)¹⁸¹

¹H NMR (MeOH-*d*₄) δ [ppm]: 8.03 (d, *J* = 8.2 Hz, NH), 7.27 – 7.39 (m, 5H, C₆H₅), 4.87 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, C1), 4.49 i 4.76 (AB, 2H, CH₂Ph), 3.88 (dt, *J* = 10.6 i 3.3 Hz, 1H, C2), 3.82 (dd, *J* = 10.6 Hz, 1H, C6), 3.66 – 3.72 (m, *J* = 3.6 i 11.6 Hz, 3H, C5, C3, C'6), 3.37 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, C4), 1.95 (s, 3H, CH₃CO).



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



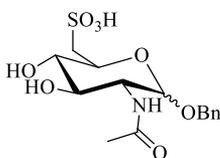
4.5 g (14.45 mmoli) pochodnej **48** oraz 15.1 g (57.19 mmoli) trifenylofosfiny rozpuszczono w 180 ml pirydyny. Do ochłodzonego w łaźni lodowej roztworu dodawano powoli 9.6 g (28.94 mmoli) tetrabromometanu tak, aby temperatura mieszaniny reakcyjnej nie przekroczyła 65 °C. Po dodaniu całej ilości CBr₄ mieszaninę ogrzewano przez 45 minut w temperaturze 60 – 65 °C. Następnie dodano do niej 45 ml metanolu i utrzymywano temperaturę 60 – 65 °C przez kolejne 20 minut. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono i oddestylowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Do powstałego oleju dodawano 210 ml toluenu (3×70 ml), a powstały roztwór dekantowano. Finalnie produkt oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Jako eluent stosowano chloroform, a następnie chloroform:metanol (60:1 v/v). Produkt krystalizował z chloroformu w postaci białych, puszystych igieł. Otrzymano 1.2 g (3.2 mmola, 22%) produktu **49** o tt 178-179°C, $[\alpha]_D^{25} +174$ (c1, MeOH)

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

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

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 7.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NH), 7.27 – 7.39 (m, 5H, C₆H₅), 5.37 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, C4-OH), 4.89 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, C3-OH), 4.73 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, C1), 4.67 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, C3), 4.45 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, C4), 3.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, C5), 3.62 (m, 2H, CH₂Ph), 3.61 i 3.63 (2×m, 2H, C6), 3.15(q, *J* = 11.2 Hz, 1H, C2), 1.82 (s, 3H, CH₃CO).

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



Metoda A

400 mg (1.07 mmola) związku **49** zawieszono w 6 ml wody i ogrzewano do temperatury 80 °C przez 3 h, a następnie dodano roztwór 500 mg (3.97 mmoli) siarczynu sodu (Na₂SO₃) w 3 ml wody. Mieszaninę reakcyjną kontynuowano ogrzewanie przez kolejne 24 godziny. Następnie roztwór ochłodzono i oczyszczano na jonicie Amberlite IRA 400 [OH⁻]. Produkt wymywano za pomocą 3% roztworu HCl. Otrzymano 170 mg (0.45 mmola, 43%), produktu **50** w postaci żółtego oleju, R_f 0.8 (octan etylu: kwas octowy: woda 2:1:1 v/v)



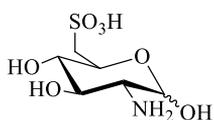
HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{15}H_{21}NSO_8$: 375.0988, znalezione 376.1084 $[M+1]^+$

1H NMR (D_2O) δ [ppm]: 7.19 – 7.26 (m, 5H, C_6H_5), 4.31 (d, $J=11.2$ Hz, 1H, C1), 4.01 (t, $J=19.5$ Hz, 1H, C3), 3.70 i 4.68 (AB, $J=3.4$ Hz, 2H, $\underline{CH_2}Ph$), 3.54 (t, $J=13.2$ Hz, 1H, C4), 3.22 (d, $J=14.2$ Hz, 1H, C5), 3.14 (t, $J=19$ Hz, 2H, C6), 2.94 (q, $J=24.9$ Hz, 1H, C2), 1.76 (s, 3H, $\underline{CH_3}CO$).

Metoda B

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

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



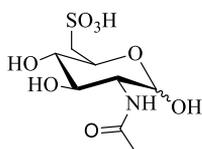
500 mg (1.33 mmola) pochodnej **50** rozpuszczono w 4 ml 18% HCl i ogrzewano do wrzenia przez 6 h. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w wodzie i oczyszczano za pomocą chromatografii jonowymiennej używając Amberlite IRA 400 $[OH^-]$. Produkt wymywano 3% roztworem HCl. Otrzymano 194 mg (0.8 mmola, 60%), produktu **51a** w postaci białego osadu będącego mieszaniną anomerów $\alpha:\beta$ (4:1), R_f 0.24 (butanol:kwas octowy:woda 2:1:1 v/v)

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_6H_{13}NSO_7$: 243.0413, znalezione 376.1084 $[M+1]^+$

1H NMR (D_2O) δ [ppm]: 5.23 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, C1 α), 4.76 (d, $J = 8$ Hz, 1H, C1 β), 4.10 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, C5 α), 3.72 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, C3 α), 3.68 (t, $J = 9$ Hz, 1H, C3 β), 3.55 (t, $J = 9$ Hz, 1H, C5 β), 3.25 (d, $J = 1.7$ i 14.7 Hz, 1H C6 α), 3.12 – 3.20 (m, 4H, C4 α , C6 β , C2 α , C4 β), 2.91 (dd, $J = 9.8$ i 14.7 Hz, 1H, C6' α), 2.9 (dd, $J = 10$ Hz, 1H, C2 β), 2.84 (t, 1H, C6' β).

^{13}C NMR (D_2O) δ [ppm]: 89.18, 72.54, 69.63, 67.98, 54.30, 52.05

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



Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze wodoru.

200 mg (0.6 mmola) związku **50** rozpuszczono w 8 ml etanolu i dodano 50 mg 10% Pd/C. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 doby. Po tym czasie odsączono katalizator, a rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany olej oczyszczano za pomocą preparatywnego TLC w układzie butanol:kwas octowy:woda (8:3:3 v/v). Produkt wymywano z żelu za pomocą 3% kwasu octowego. Po liofilizacji otrzymano 50 mg (0.13 mmola, 17%) produktu **52a** w postaci białego proszku, R_f 0.4 (butanol:kwas octowy:woda 4:1:1 v/v).

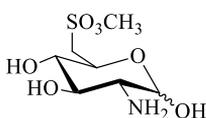
HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_8H_{15}NSO_8$: 285.2716, znalezione 284.2623 $[M-1]^-$

1H NMR (D_2O) δ [ppm]: 5.3 (d, 1H), 4.85 (d, 1H), 4.2 (t, 1H), 3.8 (t, 1H), 3.75 (t, 1H), 3.2 (d, 2H), 3.1 (m, 4H), 2.9 (m, 2H), 2.85 (t, 1H).

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

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

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



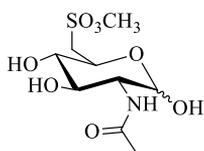
Wychodząc z 200 mg (0.82 mmol) pochodnej **51a** otrzymano 64 mg (0.25 mmola, 30%) produktu **51b** w postaci żółtego oleju, będącego mieszaniną anomerów $\alpha:\beta$ (1:4), R_f 0.4 (butanol:kwas octowy:woda 4:1:1 v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_8H_{15}NSO_8$: 257.0569, znalezione 258.0721 $[M+1]^+$

1H NMR (D_2O : CD_3OD) δ [ppm]: 5.10 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, C1), 4.10 (t, 1H, C3), 3.95 (t, 1H, C5), 3.4 – 3.6 (m, 3H, C6, C4, C2), 3.35 (s, 3H, SO_3CH_3), 2.95 (m, 1H, C'6).



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



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

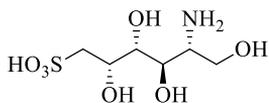
HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_9H_{17}NSO_8$: 299.0675, znalezione 298.0602 $[M-1]^-$

Dla anomeru β 1H NMR (D_2O) δ [ppm]: 4.5 (d, 1H, C1), 3.5 (s, 3H, SO_3CH_3), 3.3 – 3.4 (m, 3H), 3.13 (m, 3H), 1.75 (s, 3H, CH_3CO).

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

0.38 mmoli 2,6-dideoksy-6-sulfo-D-glukopiranozy rozpuszczono w 10 ml wody i ochłodzono w łaźni lodowej. Do roztworu dodano małymi porcjami 304 mg (8 mmoli) $NaBH_4$, a następnie reakcję mieszano w temperaturze pokojowej przez 3 h, po upływie tego czasu dodano kolejną porcję 150 mg (4 mmole) $NaBH_4$ i mieszano przez kolejne 12 h. Nadmiar borowodorku sodu rozłożono za pomocą rozcieńczonego HCl. Mieszaninę poreakcyjną oczyszczano za pomocą jonitu Amberlite IR 120 $[H^+]$. Frakcję zawierającą produkt wymywano wodą.

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

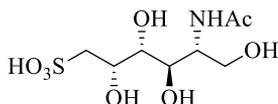


Wychodząc z 100 mg (0.4 mmola) pochodnej **51a** otrzymano 96 mg (0.39 mmola, 96%) produktu **53**, R_f 0.10 (butanol:kwas octowy:woda 2:1:1 v/v).

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_6H_{15}NSO_7$: 245.0596, znalezione 246.0601 $[M+1]^+$

1H NMR (D_2O) δ [ppm]: 3.8 (m, 2H), 3.6 (m, 1H), 3.4 (q, 2H), 3.28 (m, 2H), 2.9 (m, 1H).

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



Wychodząc z 110 mg (0.38 mmola) pochodnej **52a** otrzymano 100 mg (0.34 mmola, 90%) produktu **54**, R_f 0.14 (butanol:kwas octowy:woda 2:1:1 v/v).



HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_8H_{17}NSO_8$: 287.0670, znalezione 288.0670 $[M+1]^+$

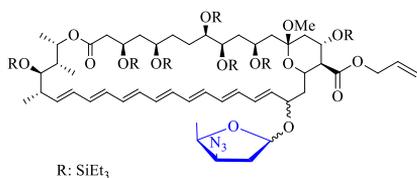
1H NMR (D_2O) δ [ppm]: 4.0 (d, 1H), 3.6 – 3.7 (m, 2H), 3.45 (d, 1H), 3.4 (q, 1H), 3.28 (AB, 2H), 2.9 (m, 1H), 2.09 (s, 3H).

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

Uwaga: Reakcję prowadzono w atmosferze argonu.

0.07 mmola odpowiedniego cukru rozpuszczono w 5 ml bezwodnego dichlorometanu, dodano sit 3 Å, a następnie 24 mg (0.12 mmola) difenylosulfotlenku, powstały roztwór mieszało przez 4 h w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 18 μ l (0.15 mmola) 2,6-lutydyny, a mieszaninę reakcyjną ochłodzono do -60 °C. Po osiągnięciu pożądanej temperatury wkroplono 12 μ l (0.07 mmola) bezwodnika trifluorometanosulfonowego. Mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury -20 °C i mieszało przez 1.5 h. W tym czasie w drugiej kolbie rozpuszczono 70 mg (0.035 mmola) aglikonu **9** w 2 ml bezwodnego dichlorometanu i dodano 16 μ l (0.14 mmola) 2,6-lutydyny. Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej pochodną cukrową wkroplono powoli roztwór **9** w temperaturze -30 °C. Następnie podniesiono temperaturę mieszaniny reakcyjnej do 0 °C i mieszało w tej temperaturze przez 1 h. Po zakończeniu reakcji mieszaninę wylano do 5 ml nasyconego roztworu $NaHCO_3$ i ekstrahowano dichlorometanem (3×15 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto 10 ml H_2O , a następnie suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono za pomocą PLC w układzie heksan:eter dietylowy (3:1 v/v)

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



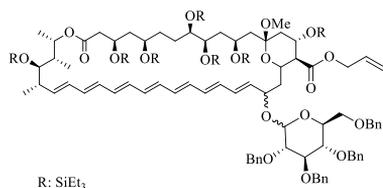
Wychodząc z 10 mg (0.07 mmola) 3-azydo-2,3,6-trideoksyrybozy oraz 70 mg (0.035 mmola) aglikonu **9** otrzymano 5 mg (0.28 μ mola, 1%) żółtego oleju **22** R_f 0.47 (heksan:eter dietylowy 3:1 v/v).

1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 6.40 – 6.03 (m, 14H), 5.44 – 5.32 (m, 2H), 5.30 – 5.20 (m, 3H), 5.02 (s, 1H), 4.65 – 4.58 (m, 2H), 4.34 – 4.24 (m, 3H), 4.17 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.10 – 3.00 (m, 1H), 2.35 – 2.28 (m, 14H), 2.07 – 1.98 (m, 5H), 1.72



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

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



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

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

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

8. Tworzenie koniugatów makrolidów polienowych z 'parasolami molekularnymi'

8.1. Ester aktywny TDBTU makrolidu polienowego – procedura ogólna

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

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

Wychodząc z 210 mg (0.18 mmola) Fmoc-AmB **4** otrzymano 220 mg (93%), R_f 0.48 (chloroform:metanol:woda 6.5:1:0.1 v/v)

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



^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 8.40 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 8.00 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 1H), 7.80 (t, $J = 7.9\text{Hz}$, 1H), 7.60 (m, 3H), 7.50 (m, 1H), 7.40 (bt, 2H), 7.00 – 7.30 (m, 3H), 5.90 – 6.40 (m, 14H), 5.30 (bd, 1H) 5.20 (m, 1H), 4.10 – 4.40 (m, 4H), 3.00 – 3.90 (m, 10H), 1.40 – 2.60 (m, 18H), 1.20 – 2.40 (m, 17H), 1.10 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 3H), 1.00 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 3H), 0.90 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 3H).

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

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

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{69}\text{H}_{88}\text{N}_4\text{O}_{20}$: 1292.5992; znalezione 1291.6053 [$\text{M}-1$]⁻

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 8.38 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 1H), 8.15 (d, $J = 7.9\text{ Hz}$, 1H), 7.97 (s, 2H), 7.89 (m, 1H), 7.83 – 7.68 (m, 3H), 7.57 – 7.48 (m, 1H), 7.42 – 7.20 (m, 3H), 6.59 – 6.01 (m, 10H), 5.48 – 5.30 (m, 2H), 4.44 (d, $J = 10.0\text{ Hz}$, 2H), 4.24 – 3.99 (m, 3H), 3.86 – 3.56 (m, 4H), 3.33 (m, 8H), 3.19 (m, 3H), 2.68 (m, 2H), 2.48 – 2.11 (m, 4H), 1.97-1.45(m, 7H), 1.42 – 1.30 (m, 10H), 1.20 (d, $J = 6.4\text{ Hz}$, 3H), 1.12 (d, $J = 6.4\text{ Hz}$, 3H), 1.03 (d, $J = 7.2\text{ Hz}$, 3H).

8.2. Koniugaty typu dwuścienny parasol molekularny/ ω -aminokwas/makrolid polienowy – procedura ogólna

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

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

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



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

1H NMR ($CDCl_3:CD_3OD$ 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 27H), 3.9 (bs, 4H), 1.4 – 2.6 (m, 104H), 0.9 – 1.4 (m, 20H), 0.7 (s, 6H).

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

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

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

1H NMR ($CDCl_3:CD_3OD$ 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 27H), 3.9 (bs, 4H), 2.9 (m, 2H), 1.4 – 2.6 (m, 104H), 0.9 – 1.4 (m, 20H), 0.7 (s, 6H).

N^3 -(*N*-amfoterycynoilo-6-aminoheksanoilo)- N^1,N^7 -di-deoksychoiloilo-spermidyna (65)

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

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{108}H_{177}N_5O_{23}$: 1912.2834; znalezione 1913.2872 $[M+1]^+$

1H NMR ($CDCl_3:CD_3OD$ 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 25H), 3.9 (bs, 4H), 1.4 – 2.6 (m, 105H), 1.0 – 1.4 (m, 20H), 0.9 (s, 6H), 0.7 (s, 6H).

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

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



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

1H NMR ($CDCl_3:CD_3OD$ 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 32H), 3.9 (s, 2H), 3.8 (s, 2H), 0.9 – 2.4 (m, 123H), 0.7 (s, 6H).

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

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

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{105}H_{173}N_5O_{23}$: 1872.2521; znalezione 1873.2529 $[M+1]^+$

1H NMR ($CDCl_3:CD_3OD$ 1:3) δ [ppm]: 5.2 – 6.2 (m, 12H), 3.0 – 4.6 (m, 29H), 2.0 – 2.8 (m, 18H), 0.9 – 2.0 (m, 114H), 0.7 (s, 6H).

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

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

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{106}H_{175}N_5O_{23}$: 1886.2678; znalezione 1887.2696 $[M+1]^+$

1H NMR ($CDCl_3:CD_3OD$ 1:3) δ : 5.2 – 6.2 (m, 12H), 3.0 – 4.6 (m, 29H), 2.0 – 2.8 (m, 20H), 0.9 – 2.0 (m, 114H), 0.7 (s, 6H).

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

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

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $C_{108}H_{179}N_5O_{23}$: 1914.2991; znalezione 1915.3059 $[M+1]^+$



^1H NMR ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 1:3) δ [ppm]: 5.2 – 6.2 (m, 12H), 3.0 – 4.6 (m, 25H), 3.9 (bs, 4H), 1.3 – 2.4 (m, 103H), 0.9 – 1.3 (m, 35H), 0.7 (s, 6H).

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

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

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{110}\text{H}_{183}\text{N}_5\text{O}_{23}$: 1942.3304; znalezione 1943.3346 $[\text{M}+1]^+$

^1H NMR ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 1:3) δ [ppm]: 5.2 – 6.2 (m, 12H), 2.9 – 4.6 (m, 37H), 1.2 – 2.6 (m, 96H), 1.2 – 0.8 (m, 34H) 0.7 (s, 6H).

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

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

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{106}\text{H}_{173}\text{N}_5\text{O}_{25}$: 1916.2420; znalezione 1917.2433 $[\text{M}+1]^+$

^1H NMR ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 25H), 3.9 (s, 2H), 3.8 (s, 2H), 1.4 – 2.6 (m, 82H), 1.2 – 1.4 (m, 25H), 1.21 – 0.9 (m, 16H), 0.7 (s, 6H).

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

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

HRMS-ESI: m/z obliczone dla $\text{C}_{110}\text{H}_{181}\text{N}_5\text{O}_{25}$: 1973.3061; znalezione 1972.3046 $[\text{M}+1]^+$

^1H NMR ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 1:3) δ [ppm]: 6.0 – 6.5 (m, 14H), 5.3 – 5.4 (m, 2H), 3.0 – 4.6 (m, 25H), 3.9 (s, 2H), 3.8 (s, 2H), 1.4 – 2.6 (m, 90H), 1.2 – 1.4 (m, 25H), 1.21 – 0.9 (m, 16H), 0.7 (s, 6H).



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

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

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

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

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

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

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

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

Summary

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

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

Conjugates of amphotericin B and nystatin A₁ with 'molecular umbrellas' composed of cholic and deoxycholic acid derivatives were constructed. The former but not the latter demonstrated improved selective toxicity in comparison to the mother antibiotics.

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



Bibliografia

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



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



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



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



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



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



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



107. D. M. Knapp, E. P. Gillis, M. D. Burke. A General Solution for Unstable Boronic Acids: Slow-Release Cross-Coupling from Air-Stable MIDA Boronates. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6961-6963.
108. N. Salewska. "Synteza i charakterystyka *N*-podstawionych pochodnych antybiotyków przeciwgrzybowych z grupy makrolidów polienowych." Politechnika Gdańska, 2012.
109. K. Szwarz, M. Płosiński, K. Czerniejewska, T. Laskowski, A. Leniak, J. Czub, P. Kubica, P. Sowiński, J. Pawlak, E. Borowski, Intramolecular transformation of an antifungal antibiotic nystatin A₁ into its isomer, *iso*-nystatin A₁ - structural and molecular modeling studies. *Magn. Reson. Chem.* **2016**, *54*, 953-961.
110. A. Oku, M. Kinugasa, T. Kamada Deprotection of Acetals and Silyl Ethers by DDQ. Is DDQ a Neutral Catalyst? *Chem. Lett.* **1993**, *22*, 165-168.
111. K. Tanemura, T. Suzuki, T. Horaguchi. 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone as a mild and efficient catalyst for the deprotection of acetals. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, *14*, 979.
112. E. Lee-Ruff, F. J. Ablenas. Oxidation of allyl and benzyl ethers by 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ). *Can. J. Chem.* **1989**, *67*, 699-702
113. R. V. Stick, S. J. Williams Carbohydrates: the essential Molecules of Life. Chapter 4. Formation of the Glycosidic Linkage. ed. E. Fisher, Elsevier, 2009, 133-202.
114. P. J. Garegg, P. Konradsson, I. Kvarnstrom, T. Norberg, S. C. T. Svensson, B. Wigilius. Studies on Koenigs-Knorr Glycosidation. *Acta Chem. Scand.* **1985**, *39*, 569-577.
115. K. Igarashi. The Koenigs-Knorr Reaction. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1977**, *34*, 243-283.
116. P. G. Scheurer, F. Smith. Synthesis of Acetobromo Sugars. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 3224-3224.
117. E. Kaya, F. Sonmez, M. Kucukislamoglu, M. Nebioglu. Selective anomeric deacetylation using zinc acetate as catalyst. *Chem. Pap.* **2012**, *66*, 312-315.
118. B. A. Garcia, D. Y. Gin. Dehydrative glycosylation with activated diphenyl sulfonium reagents. Scope, mode of C(1)-hemiacetal activation, and detection of reactive glycosyl intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4269-4279.
119. J. Jarý, Z. Kefurtová, J. Kovář. Amino sugars. XX. Synthesis of 3-amino- and 6-amino-deoxyhexoses of the gluco and allo configuration. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1969**, *34*, 1452-1458.
120. B. Furman, R. Łysek, Ł. Matyjasek, W. Wojtkielewicz, M. Chmielewski. Synthesis of solid-phase bound sulfonate esters. *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 2795-2802.



121. M. Kloosterman, M. P. De Nijs, J. H. Van Boom. Synthesis of 1,6-anhydro-2-O-trifluoromethanesulphonyl- α -D-mannopyranose Derivatives and their conversion into the corresponding 1,6-anhydro-2-azido-2-deoxy- β -D-glucopyranoses: A convenient and efficient approach. *J. Carbohydr. Chem.* **1986**, *5*, 215-233.
122. J. M. Denu. O-Acetyl-ADP-ribose non-hydrolyzable analogs. US 20070225246 A1, 2007.
123. S. Hanessian, J.-M. Vatele. Design and reactivity of organic functional groups: imidazolylsulfonate (imidazylate) - an efficient and versatile leaving group. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3579-3582.
124. E. Fischer, K. Zach. Neue Synthese von basen der zuckergruppe. *Chem. Ber.* **1911**, *44*, 132-135.
125. S. Hanessian, N. R. Plessas. Reaction of O-benzylidene sugars with N-bromosuccinimide. II. Scope and synthetic utility in the methyl 4,6-O-benzylidenehexopyranoside series. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1035-1044.
126. K. Tokuyama. Sorboses. V. The Reactions of the tosyloxy groups of 2,3-O-isopropylidene- α -L-sorbofuranoses in liquid ammonia. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1964**, *37*, 1133-1137.
127. M. L. Wolfrom, J. Bernsmann, D. Horton. Synthesis of amino sugars by reduction of hydrazine derivatives. 5-Amino-3,6-anhydro-5-deoxy-L-idose Derivatives. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 4505-4509.
128. M. L. Wolfrom, F. Shafizadeh, R. K. Armstrong, T. M. S. Han. Synthesis of amino sugars by reduction of hydrazine derivatives; D- and L-ribosamine, D-lyxosamine. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 3716-3719.
129. P. Teodorović, R. Slättegård, S. Oscarson. Improved synthesis of 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-azido-2-deoxy- α -D-mannopyranose. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2675-2676.
130. C. L. Stevens, R. P. Glinski, K. G. Taylor, F. Sirokman. Rearrangement reactions of hexose 4-O-sulfonates in the presence of azide and phthalimide nucleophiles. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 592-596.
131. J. Alais, S. David. A precursor to the beta-pyranosides of 3-amino-3,6-dideoxy-D-mannose (mycosamine). *Carbohydr. Res.* **1992**, *230*, 79-87.
132. S. C. Hung, C. C. Wang, S. W. Chang, C. S. Chen. 1,6-Anhydro- β -l-hexopyranoses as valuable building blocks toward the synthesis of l-gulosamine and l-altrose derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1321-1324.
133. S. Koto, N. Kawakatsu, S. Zen. The Synthesis of 3-Amino-3-deoxy-D-allose and related substances. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46*, 876-880.
134. S. Anjum, N. D. Vetter, J. E. Rubin, D. R. J. Palmer. Synthesis of 3,3'-neotrehalosdiamine and related 1,1'-aminodisaccharides using disarmed, armed, and superarmed building blocks. *Tetrahedron.* **2013**, *69*, 816-825.
135. T. Muhizi, S. Grelier, V. Coma. Synthesis and antibacterial activity of aminodeoxyglucose derivatives against *Listeria innocua* and *Salmonella typhimurium*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8770-8775.
136. W. N. Haworth, W. H. G. Lake, S. Peat. 59. The configuration of glucosamine (chitosamine). *J. Chem. Soc.* **1939**, 271-274.



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



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



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



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

Dorobek naukowy

Publikacje w czasopismach z listy JCR:

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

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

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

Konferencje naukowe:

Prezentacje ustne

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

Artykuły pokonferencyjne

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

Sesje posterowe

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

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

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



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

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

