

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Technologii Leków i Biochemii

Rozprawa doktorska

**PROJEKTOWANIE, SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI POŁĄCZEŃ BICYNY ORAZ
INHIBITORA SYNTAZY GLUKOZAMINO-6-FOSFORANU**

mgr inż. Dominik Koszel

Promotor: prof. dr hab. inż. Ryszard Andruszkiewicz

Gdańsk 2010

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi **prof. dr hab. inż. Ryszardowi Andruszkiewiczowi** za życzliwą opiekę oraz pomoc merytoryczną.*

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

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
1. WSTĘP	9
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
2.1 Syntaza glukozamino-6-fosforanu	10
2.2 Inhibitory syntazy glukozamino-6-fosforanu	15
2.3 Transport inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu do komórki patogenicznej ..	19
3. CEL I ZAKRES PRACY	23
4. BADANIA WŁASNE – WYNIKI I DYSKUSJA	24
4.1 Synteza związków	24
4.1.1 Synteza estrów 1-chloroalkilowych odpowiednich kwasów	24
4.1.2 Synteza kwasu N^2 - <i>tert</i> -butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego	25
4.1.3 Syntezy estrów acyloksymetylowych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6)	27
4.1.4 Synteza estrów <i>tert</i> -butylowych pochodnych N,N -(2-acyloksyetylo)glicyny	28
4.1.5 Synteza estrów acyloksymetylowych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego	30
4.1.6 Synteza pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (16)	33
4.2 Określenie powinowactwa pochodnych FMDP do błony biologicznej w oparciu o wysokosprawną chromatografię cieczową na kolumnie IAM	35
4.3 Aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza otrzymanych związków	40
4.4.1 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa estrów latentnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego	40
4.4.2 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego	41
4.4.3 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa estrów latentnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego....	42
4.4 Ocena trwałości otrzymanych pochodnych	43
4.5 Ogólna charakterystyka otrzymanych związków	45
4.5.1 Trifluorooctany estrów latentnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego	45
4.5.2 Chlorowodorki estrów acyloksymetylowych pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego....	45
4.5.2 Chlorowodorki estrów acyloksymetylowych pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego....	46
4.5.3 Trifluorooctany kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego	48
5. STRESZCZENIE I WNIOSKI	49
6. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	52
6.1 Synteza estrów 1-chloroalkilowych odpowiednich kwasów (1)	54
6.1.1 Octan chlorometylu (1a).....	54
6.1.2 Ester chlorometylowy kwasu piwalinowego (1b).....	54
6.1.3 Ester chlorometylowy kwasu 2-metylopropanowego (1c).....	54
6.1.4 Ester chlorometylowy kwasu fenyllooctowego (1d).....	55
6.1.5 Ester chlorometylowy kwasu 2-etylobutanowego (1e).....	55
6.1.6 Octan 1-chloroetylu (1f).....	55
6.1.7 Octan 1-chloropropylu (1g).....	56

6.2 Synteza kwasu N^2 - <i>tert</i> -butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (4).....	56
6.2.1 N^2 - <i>tert</i> -butoksykarbonylo-L-asparagina	56
6.2.2 Kwas N^2 - <i>tert</i> -butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowy.....	56
6.2.3 Monoester metylowy kwasu maleinowego.....	57
6.2.4 Monoester metylowy kwasu fumarowego	57
6.2.5 Synteza esteru <i>N</i> -hydroksysukcynoimidowometylowego kwasu fumarowego (2).....	57
6.2.6 Synteza kwasu N^2 - <i>tert</i> -butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego. (6)	57
6.3 Ogólny sposób syntezy estrów latentnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6).....	58
6.3.1 Ester acetoksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6a).....	59
6.3.2 Ester piwaloiloksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6b)	59
6.3.3 Ester 2-metylopropionylkoxymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6c).....	60
6.3.4 Ester fenyloacetoksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6d)	60
6.3.5 Ester 2-etylobutyryloksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6e).....	61
6.3.6 Ester 1-(acetoksy)etylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6f)	61
6.3.7 Ester 1-(acetoksy)propylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6g)	62
6.3.8 Ester 1-(etoksykarbonyloksy)etylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6h)	62
6.4 Otrzymywanie estrów <i>tert</i> -butylowych pochodnych <i>N,N</i> -(2-acyloksy-etylo)glicyny (9).....	63
6.4.1 Synteza estru <i>tert</i> -butylowego <i>bis-N,N</i> -(2-hydroksyetylo)glicyny (8)	63
6.4.2 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>bis-N,N</i> -(2-acetyloksyetylo)glicyny (9a)	63
6.4.3 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>bis-N,N</i> -(2-propionylkoxsyetylo)glicyny (9b)	63
6.4.4 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>bis-N,N</i> -(2-butyryloksyetylo)glicyny (9c)	64
6.4.5 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>bis-N,N</i> -(2-pentanoiloksyetylo)glicyny (9d).....	64
6.4.6 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>bis-N,N</i> -(2-heksanoiloksyetylo)glicyny (9e).....	65
6.4.7 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>bis-N,N</i> -(2-benzoiloksyetylo)glicyny (9f).....	65
6.4.8 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>bis-N,N</i> -(2-(3-bromobenzoiloksy)etylo)glicyny (9g).....	65
6.4.9 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>bis-N,N</i> -(2-nikotynoiloksyetylo)glicyny (9h)	66
6.4.10 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>N</i> -(2-(acetyloksy)etylo)- <i>N</i> -(2-(benzoiloksy)etylo)glicyny (9i).....	66
6.4.11 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>N</i> -(2-(acetyloksy)etylo)- <i>N</i> -(2-(3-(trifluorometylo)benzoiloksy)etylo)glicyny (9j).....	67
6.4.12 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>N</i> -(2-(acetyloksy)etylo)- <i>N</i> -(2-(nikotynoiloksy)etylo)-glicyny (9k)	67
6.4.13 Ester <i>tert</i> -butylowy <i>bis-N,N</i> -(2-(2,2-dimetlopropionylkoxsy)etylo)glicyny (9l).....	68
6.5 Ogólny sposób syntezy chlorowodoroków estrów acyloksymetylowych kwasu N^2 -(<i>N,N</i> -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13).....	68

6.5.1 Chlorowodorek esteru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-acetoksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13a)	69
6.5.2 Chlorowodorek esteru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-propionylksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13b)...	70
6.5.3 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-butyryloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13c)...	70
6.5.4 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-pentanoiloksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13d)...	70
6.5.5 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-heksanoiloksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13e)...	71
6.5.6 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-benzoiloksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13f) ...	71
6.5.7 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-(3-bromobenzoiloksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13g)	72
6.5.8 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-nikotynoiloksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13h)...	72
6.5.9 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>N</i> -(2-(acetoksoxyetylo)- <i>N</i> -(2-(benzoiloksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13i)	72
6.5.10 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>N</i> -(2-(acetoksoxyetylo)- <i>N</i> -(2-((3-trifluorometylo)benzoiloksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13j)	73
6.5.11 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>N</i> -(2-(acetyloksyetylo)- <i>N</i> -(2-(nikotynoiloksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13k)	73
6.5.12 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-(2,2-dimetylopropionylksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13l)	74
6.5.13 Chlorowodorek estru piwaloiloksoxyetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-acetoksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13m) .	74
6.5.14 Chlorowodorek estru 2-etylobutyryloksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(acetoksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13n)	74
6.5.15 Chlorowodorek estru 2-metylopropionylksoxyetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(acetoksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13o)	75
6.5.16 Chlorowodorek estru fenyloacetoksymetylowy N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(acetoksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13p)	75
6.5.17 Chlorowodorek estru 1-(acetoksoxyetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(acetoksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13r).....	75
6.5.18 Chlorowodorek estru 1-(acetoksoxy)propylowy N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(acetoksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13s)	76
6.5.19 Chlorowodorek estru 1-(etoksoykarbonyloksyetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(acetoksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13t)	76
6.5.20 Chlorowodorek estru piwaloiloksoxyetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-propionylksoxyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13u).....	77

6.5.21 Chlorowodorek estru piwaloiloksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-benzoiloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13w).....	77
6.5.22 Chlorowodorek estru 2-etylobutyryloksymetylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(propionyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13v).....	77
6.7 Ogólny sposób syntezy trifluorooctanów pochodnych kwasu N^2 -(<i>N,N</i> -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (16)78	
6.7.1 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-acetoksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowy (17a).....	79
6.7.2 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-propionyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17b).....	80
6.7.3 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-butyryloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17c).....	80
6.7.4 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-pentanoiloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17d).....	81
6.7.5 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-heksanoiloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17e).....	81
6.7.6 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-benzoiloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17f).....	82
6.7.7 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-(3-bromobenzoiloksy)etylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17g).....	82
6.7.8 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-nikotynoiloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksy-fumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17h).....	83
6.7.9 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>N</i> -(2-(acetoksy)etylo)- <i>N</i> -(2-(benzoiloksy)etylo)-glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17i).....	83
6.7.10 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>N</i> -(2-(acetoksy)etylo)- <i>N</i> -(2-(3-trifluorometylo)-benzoiloksy)etylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17j).....	84
6.7.11 Trifluorooctan kwasu N^2 -(<i>N</i> -(2-(acetyloksy)etylo)- <i>N</i> -(2-(nikotynoiloksy)etylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17k)...	85
6.7.12 Ester <i>tert</i> -butylowy kwasu N^2 -(<i>bis-N,N</i> -(2-(2,2-dimetylopropanoiloksy)etylo)-glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (17l).....	85
6.8 Wyznaczanie powinowactwa związków do błony biologicznej ($\log k'_{IAM}$).....	86
6.9 Wyznaczenie trwałości otrzymanych pochodnych.....	87
7. WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO.....	88
8. LITERATURA.....	89

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ac ₂ O	-	bezwodnik octowy
ADGP	-	2-amino-2-deoksy-D-glucitolo-6-fosforan
AMB	-	amfoterycyna B
AMPO	-	oksym arabinoso-5-metylofosfonianu
APO	-	oksym arabinoso-5-fosforanu
ATP	-	adenozynotrifosforan
Boc	-	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
Boc ₂ O	-	diwęglan di- <i>tert</i> -butylu
BocFMDP	-	kwas <i>N</i> ² - <i>tert</i> -butoksykarbonylo- <i>N</i> ³ -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diamino- propanowy
BSDP	-	kwas <i>N</i> ³ -(L-2-bromobursztynamoilo)-L-2,3-diaminopropanowy
CH ₂ Cl ₂	-	chlorek metylenu
DBU	-	1,8-diazobicyklo[5.4.0]-undec-7-en
DCC	-	<i>N,N</i> '-dicykloheksylokarbodiimid
DCU	-	<i>N,N</i> '-dicykloheksylomocznik
DMAP	-	<i>N,N</i> -dimetyloaminopirydyna
DMF	-	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DON	-	6-diazo-5-okso-L-norleucyna
DPPA	-	azydofosforan difenyłu
EADP	-	kwas <i>N</i> ³ -(LD- <i>trans</i> -epoksybursztynamoilo)-L-2,3-diaminopropanowy
Et ₃ N	-	trietyloamina
FCDP	-	kwas <i>N</i> ³ -fumaroiło-L-2,3-diaminopropanowy
FMDP	-	kwas <i>N</i> ³ -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowy
Fru-6-P	-	D-fruktozo-6-fosforan
GAT	-	domena glutaminowa syntazy glukozamino-6-fosforanu
GlcN-6-P	-	D-glukozamino-6-fosforan
¹ H NMR	-	spektroskopia protonowego jądrowego rezonansu magnetycznego
HOSu	-	<i>N</i> -hydroksysukcynoimid
IAM	-	immobilizowana sztuczna membrana
MF-AME	-	ester metylowy <i>N</i> -metylo- <i>N</i> -fruktopiranozyloamfoterycyny B
MPAH	-	hydroksymolakton 5-metylenofosfono-D-arabinozy
PIDA	-	diocetan jodobenzenu

- R_f - stosunek długości drogi przebytej przez substancje do drogi przebytej przez fazę ruchomą w chromatografii cienkowarstwowej.
- TFA - kwas trifluorooctowy
- THF - tetrahydrofuran
- TLC - chromatografia cienkowarstwa
- t.t. - temperatura topnienia
- t.w. - temperatura wrzenia
- UDP-GlcNAc - 5'-difosfourydyno-*N*-acetylo-D-glukozamina

1. WSTĘP

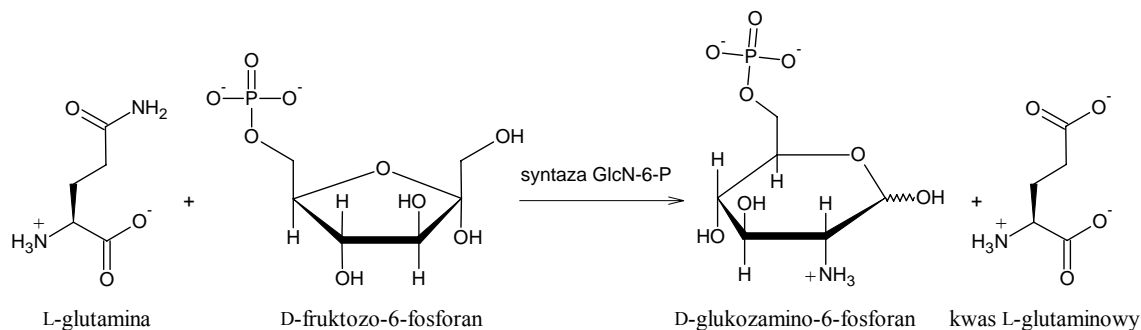
Znaczne zmniejszenie śmiertelności wskutek infekcji bakteryjnych spowodowane jest głównie wprowadzeniem do leczenia nowych, skutecznych i bezpiecznych antybiotyków. Do najważniejszych należą półsyntetyczne antybiotyki β -laktamowe z grupy cefalosporyn i penicylin, antybiotyki aminoglikozydowe, makrolidowe i glikopeptydowe. Powszechne stosowanie antybiotyków nie tylko nie wyeliminowało całkowicie zagrożeń spowodowanych przez bakterie, lecz przeciwnie stało się przyczyną nowych zagrożeń. Zagrożenia te związane są głównie z pojawieniem się szczepów opornych¹, a w szczególności szczepów o oporności wielolekowej. Innym niebezpieczeństwem spowodowanym powszechnym stosowaniem antybiotyków jest zakłócenie równowagi flory bakteryjnej człowieka, co prowadzi do wzrostu ilości infekcji grzybowych. Grzybnice układowe są szczególnie niebezpieczne dla ludzi z osłabionym układem odpornościowym. Problem ten dotyczy głównie pacjentów przyjmujących leki immunosupresyjne^{2,3}, chorych na AIDS⁴, czy nowotwory. Grzybnice narządów wewnętrznych spowodowane są przeważnie przez drobnoustroje z rodzaju *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* i *Histoplasma*. Pomimo wieloletnich prac nad lekami zwalczającymi infekcje grzybowe do tej pory nie wprowadzono skutecznych i zarazem bezpiecznych chemoterapeutyków⁵⁻¹⁰. Powodem tych niepowodzeń jest bliskie pokrewieństwo obu eukariotycznych organizmów: człowieka i drobnoustroju grzybowego. Poszukiwanie nowych i skutecznych chemoterapeutyków prowadzone mogą być w kierunku modyfikacji chemicznej istniejących już grup związków w celu usunięcia ich wad lub w kierunku poszukiwania nowych celów molekularnych i otrzymania związków oddziałujących z nimi.

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1 Syntaza glukozamino-6-fosforanu

Wieloletnie prace prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej doprowadziły do zaproponowania enzymu syntazy glukozamino-6-fosforanu jako celu molekularnego dla projektowania nowych chemoterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych i przeciwgrzybiczych^{11,12}.

Enzym syntaza glukozamino-6-fosforanu¹³ (w skrócie: syntaza GlcN-6-P), dla którego przyjęto systematyczną nazwę L-glukozamina: D-fruktoza-6-fosforan amidotransferaza, EC 2.6.1.16, należy do grupy amidotransferaz glutaminy. Enzym ten katalizuje pierwszą reakcję w szlaku biosyntezy heksozamin, podczas której dochodzi do przeniesienia grupy aminowej z L-glutaminy na D-fruktozo-6-fosforan (Fru-6-P), a następnie izomeryzacji powstałej ketozaminy z utworzeniem D-glukozamino-6-fosforanu (GlcN-6-P), według schematu:



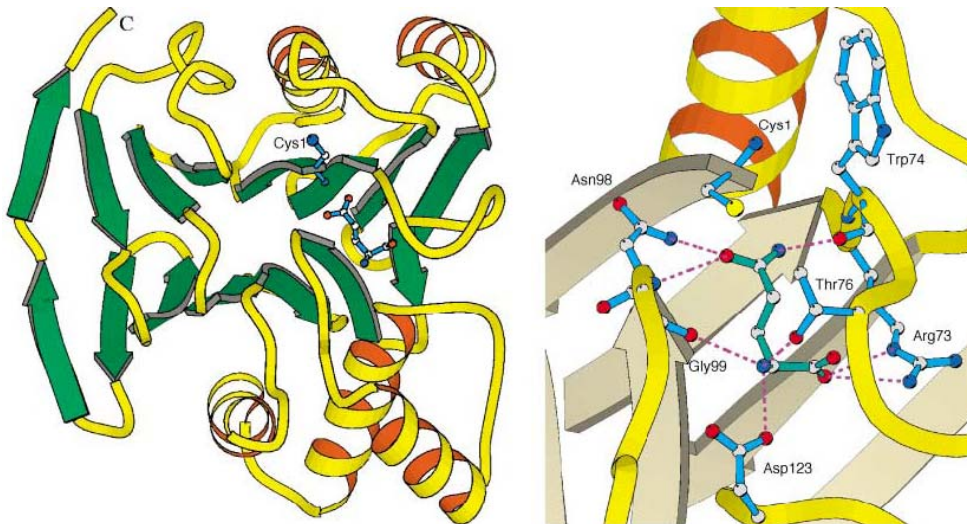
Schemat 1. Reakcja katalizowana przez syntazę glukozamino-6-fosforanu.

Powstający GlcN-6-P jest prekursorem 5'-difosfourydyno-*N*-acetylo-D-glukozaminy (UDP-GlcNAc), substratu będącego istotnym elementem w biosyntezie makromolekuł zawierających aminocukry. UDP-GlcNAc służy jako aktywna forma *N*-acetylglukozaminy wchodzącej w skład peptydoglikanu i lipopolisacharydów u bakterii, chityny i mannoprotein u grzybów¹⁴ oraz glikoprotein i mukopolisacharydów u organizmów wyższych. Pomimo szerokiego występowania syntazę glukozamino-6-fosforanu można uznać za dobry cel molekularny dla chemoterapeutyków, z uwagi na różnice konsekwencyjne wynikające z inhibicji enzymu u różnych organizmów. Zablokowanie enzymu w komórkach grzybowych powoduje zahamowanie biosyntezy makromolekuł ściany komórkowej zawierających glukozaminę, co w konsekwencji prowadzi do głębokich zmian morfologicznych i lizy

komórki¹⁵. W komórkach ssaczy zahamowanie biosyntezy glikoprotein nie powoduje efektów toksycznych z uwagi na długi okres półtrwania istniejących białek oraz szybką ekspresję genu kodującego ten enzym^{16,17}.

Reakcja katalizowana przez syntazę GlcN-6-P jest nieodwracalna, nie wymaga udziału ATP ani żadnych innych kofaktorów¹⁸. W przeciwieństwie do innych enzymów z grupy amidotransferaz, syntaza GlcN-6-P jest jedynym enzymem, który nie może wykorzystywać egzogenego amoniaku jako alternatywnego źródła azotu¹⁹. Enzymy będące amidotransferazami posiadają dwie domeny: domenę glutaminową (GAT) odpowiedzialną za związanie glutaminy oraz domenę wiążącą drugi substrat pełniącą funkcje syntazy lub syntetazy²⁰. W zależności od budowy domeny wiążącej glutaminę, amidotransferazy dzielimy na dwie grupy trpG (klasa I lub triada) oraz purF (klasa II lub *Ntn*). W pierwszej grupie, kluczowa dla aktywności wszystkich amidotransferaz reszta cysteinylowa zlokalizowana jest w pozycji pomiędzy resztami aminokwasów 80-90, natomiast w grupie purF, do której zaliczana jest również syntaza GlcN-6-P reszta ta jest zlokalizowana jako *N*-terminalny aminokwas łańcucha białkowego²¹.

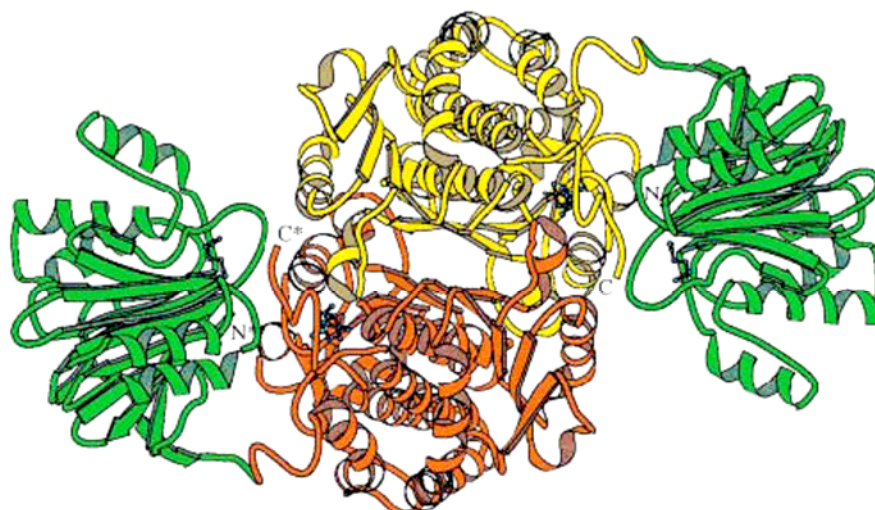
Znane są sekwencje aminokwasowe kilkudziesięciu syntaz glukozamino-6-fosforanu pochodzenia bakteryjnego, siedmiu eukariotycznych oraz jedna wirusowa. Bez względu na pochodzenie, wszystkie te białka zawierają domenę *N*-końcową wiążącą glutaminę i wykazującą aktywność amidohydrolazową oraz *C*-terminalną katalizującą izomeryzację D-fruktozo-6-fosforanu do D-glukozamino-6-fosforanu. Tak więc syntaza GlcN-6-P bierze udział w dwóch reakcjach enzymatycznych: generowania cząsteczki NH₃ z ugrupowania amidowego glutaminy i przeniesienie go na akceptor D-fruktozo-6-fosforan oraz jego izomeryzacji do D-glukozamino-6-fosforanu. Natywny enzym pochodzenia bakteryjnego zbudowany jest z dwóch identycznych podjednostek o łącznej masie 130-150 kDa, natomiast enzym pochodzenia eukariotycznego jest homotertamerem o masie 320-340 kDa²². Eukariotyczna syntaza GlcN-6-P jest hamowana na zasadzie sprzężenia zwrotnego przez UDP-GlcNAc, w przypadku prokariotycznej wersji enzymu brak jest tego typu kontroli²³. Dodatkowo stwierdzono że tylko enzym z *Eucaryota* podlega fosforylacji co zmienia jego aktywność – fosforylacja zwiększa aktywność enzymu, lecz nie jest niezbędna dla jego aktywności²⁴. Znana jest struktura krystalograficzna obu domen syntazy glukozamino-6-fosforanu pochodzącej z *Escherichia coli*^{25,26} oraz struktura krystalograficzna natywnej syntazy GlcN-6-P również z *E. coli*²⁷.



Rys. 1. Struktura *N*-terminalnej domeny syntazy GlcN-6-P w kompleksie z substratem L-glutaminą³¹. Z prawej strony zbliżenie centrum aktywnego enzymu.



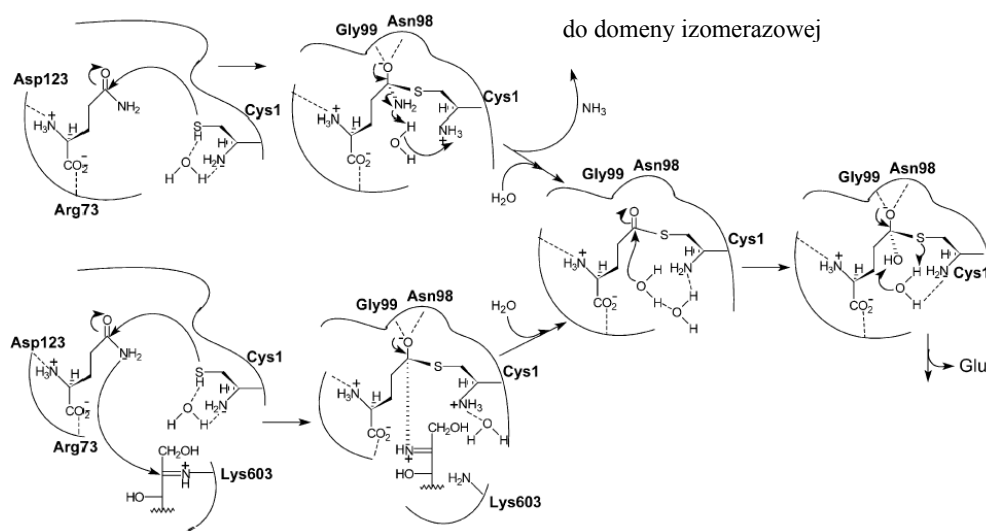
Rys. 2. Struktura dimeru domeny izomerazowej syntazy GlcN-6-P z *Escherichia coli* w kompleksie z produktem D-glukozamino-6-fosforanem²⁶.



Rys. 3. Struktura natywnej dimerycznej syntazy GlcN-6-P z *E. coli*³¹.

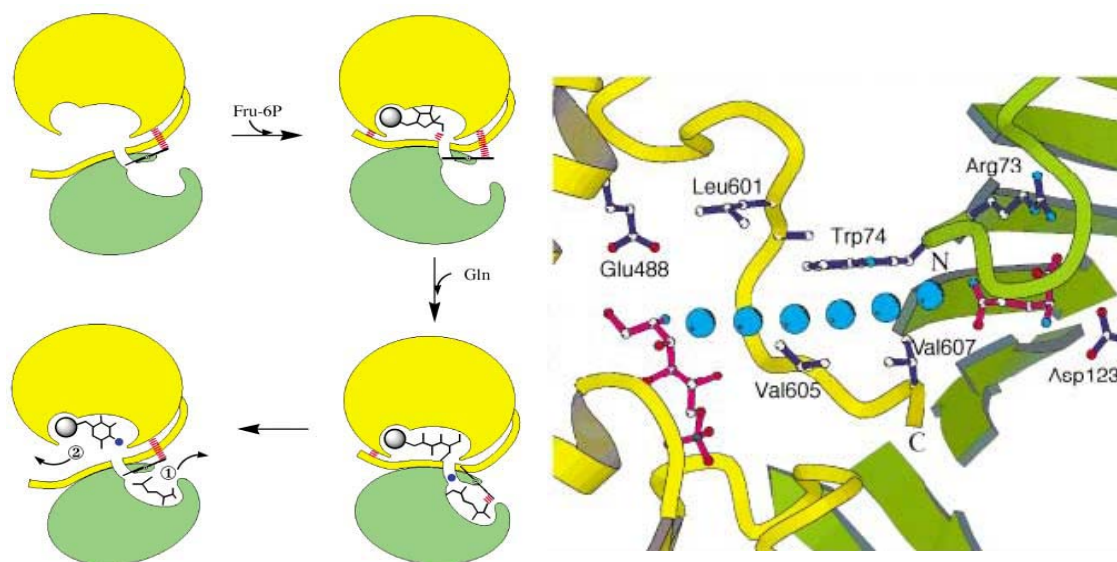
Obie domeny enzymu można od siebie oddzielić przez kontrolowaną proteolizę przy pomocy chymotrypsyny, przy czym tak otrzymane fragmenty posiadają zdolność hydrolizy L-glutamininy oraz izomeryzacji D-fruktozo-6-fosforanu.

Reakcja katalizowana przez syntazę GlcN-6-P rozpoczyna się od związania D-Fru-6-P przez resztę Lys603 z domeny C-końcowej z utworzeniem zasady Schiffa^{32,33}. Początkowo brak było dowodów wskazujących na to, czy syntaza GlcN-6-P katalizuje otwarcie pierścienia cukru, czy wiąże tylko Fru-6-P w formie otwartej struktury łańcuchowej. Obecnie pośrednie obserwacje wskazują na pierwszą z tych możliwości^{28,34}.



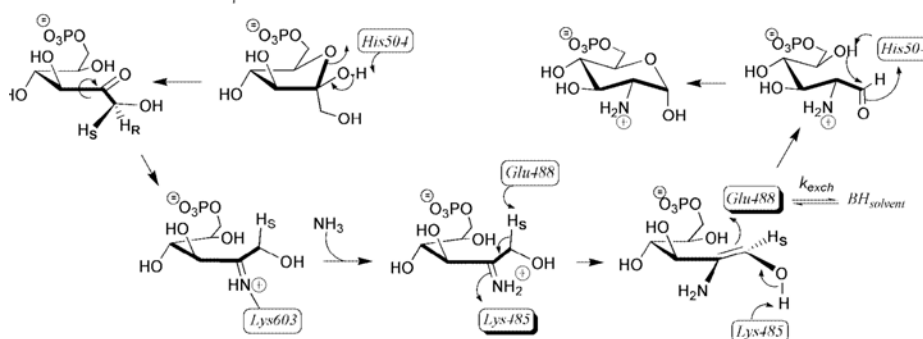
Schemat 2. Proponowany mechanizm reakcji katalizowanej przez domenę glutaminową¹³.

Związanie Fru-6-P powoduje zmiany konformacyjne w domenie enzymu i umożliwia zbliżenie się reszty Cys1 do centrum aktywnego enzymu³⁵. Następnie dochodzi do związania drugiego substratu L-glutminy z jednoczesnym utworzeniem γ -tioesteru kwasu L-glutaminowego. Reszta Cys1 bierze udział bezpośrednio w hydrolizie L-glutminy, niemniej także inne reszty aminokwasowe są zaangażowane w wiązaniu L-glutminy: Arg73 i Asp123 i bezpośrednio oddziałują z grupą α -karboksylową i α -aminową substratu, przy pośrednim udziale Thr76 i His77²⁹. Natomiast w stabilizacji produktu przejściowego uczestniczy Gly99 oraz Asn98. Proponowane są dwa mechanizmy w których dochodzi do utworzenia stanu przejściowego w którym enzym jest kowalencyjnie związany z substratem (Rys. 4). Pierwszy zakłada uwolnienie cząsteczki amoniaku i przeniesienie jej do domeny izomerazowej²⁷, natomiast w drugim następuje bezpośredni atak pary elektronowej azotu amidowego na związany Fru-6-P³⁶. Prowadzone są szczegółowe badania sposobu transportu uwolnionej w domenie glutaminowej cząsteczki amoniaku z wykorzystaniem analogów stanu przejściowego³⁷⁻³⁹. Eksperymenty wskazują na istnienie hydrofobowego kanału pomiędzy dwoma domenami^{27,30,40}. Badania dynamiki molekularnej wskazują na kluczową rolę reszty Tyr74, pełniącą rolę uszczelnienia kanału oraz zaangażowanie reszt Ala602 i Val605⁴¹.



Rys. 4. Schematyczny cykl katalityczny syntazy GlcN-6-P wraz z tworzeniem hydrofobowego kanału pomiędzy domenami³¹.

W domenie izomerazowej reszta His504 zapoczątkowuje reakcję otwarcia pierścienia D-Fru-6-P, natomiast w tworzenie zasady Schiffa uczestniczy Lys603^{34,42}, a reszta Glu488 służy jako akceptor i donor protonu. Proponowany mechanizm reakcji katalizowanej w domenie izomerazowej został przedstawiony na schemacie 3.

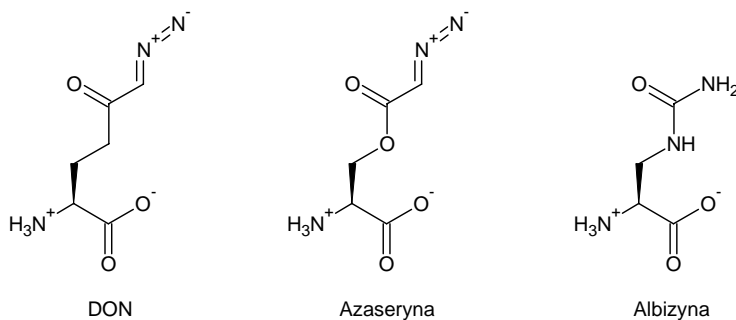


Schemat 3. Mechanizm reakcji katalizowanej w domenie izomerazowej³¹.

Obecnie znana jest struktura krystalograficzna domeny izomerazowej enzymu z *Candida Albicans*⁴³, natomiast nie jest znana struktura krystalograficzna całej eukariotycznej syntazy GlcN-6-P, chociaż znane są sekwencje aminokwasowe takich białek, a ostatnio otrzymano homogenną ludzką syntazę GlcN-6-P⁴⁴. Przepuszczalnie pomimo występowania znacznych różnic pomiędzy syntazą GlcN-6-P pochodzenia prokariotycznego i eukariotycznego mechanizm reakcji katalizowanej przez ten enzym reakcji powinien być bardzo podobny z uwagi na dużą homologię regionów biorących udział w katalizie.

2.2 Inhibitory syntazy glukoamino-6-fosforanu

Wśród inhibitorów syntazy GlcN-6-P pierwszą grupę stanowią inhibitory niespecyficzne⁴⁵. Związki te hamują aktywność wielu enzymów i z tego powodu nie mogą być rozpatrywane jako potencjalne chemoterapeutyki. Wśród nich mamy analogi glutaminy,

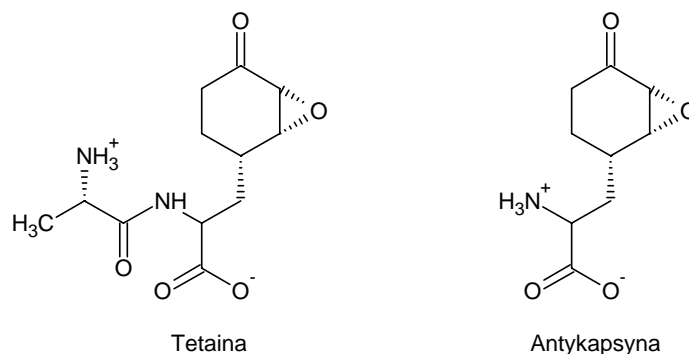


Rys. 5. Niespecyficzne inhibitory syntazy GlcN-6-P.

które blokują niespecyficznie centra aktywne enzymów dla których glutamina jest donorem grupy aminowej: DON (6-diazo-5-okso-L-norleucyna)⁴⁶, azaseryna (*O*-diazaoacetylo-L-seryna)⁴⁷ oraz albizyna - *N*³-karbamoilowa pochodna kwasu L-2,3-diaminopropanowego. Względem syntazy GlcN-6-P właściwości inhibicyjne wykazuje również szereg małych cząsteczek oddziałujących z centrum aktywnym enzymu: *N*-etyloimid kwasu malonowego, jodoacetamid²² czy fosforan pirydoksalu.³⁶

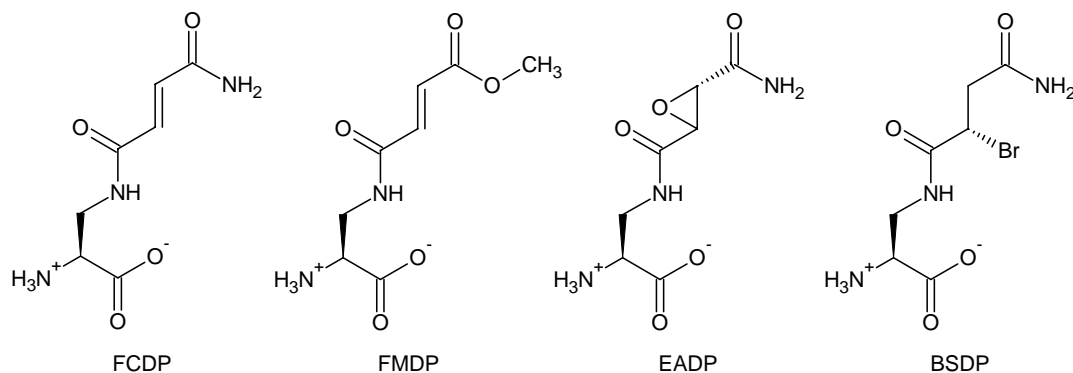
Analogi glutaminy wykazujące aktywność inhibicyjną posiadają w swojej strukturze ugrupowanie o charakterze elektrofilowym reagujące z resztą Cys1, znajdującą się w centrum aktywnym enzymu^{37,46}. Tak więc skuteczny, a zarazem selektywny inhibitor syntazy GlcN-6-P powinien posiadać w swojej strukturze reaktywne ugrupowanie alkilujące resztę Cys1, ale równocześnie nie reagujące z innymi ugrupowaniami o charakterze nukleofilowym występującymi w komórce.

Pierwszym selektywnym inhibitorem syntazy GlcN-6-P był dipeptydowy antybiotyk tetaina izolowany z brzezki fermentacyjnej *Bacillus pumilus*^{48,49}. Badania nad mechanizmem działania tetatiny wykazały, iż jest ona transportowana do wnętrza komórek na drodze transportu aktywnego, a następnie hydrolizowana przez peptydazy z uwolnieniem *C*-końcowego aminokwasu - antykapsyny. Tetaina nie znalazła zastosowania w chemoterapii z uwagi na swoją nietrwałość oraz działanie cytotoksyczne wynikające z oddziaływania z polimerazą DNA i polimerazą RNA II⁵⁰. Antykapsyna jest niebiałkowym aminokwasem o właściwościach inhibicyjnych, wyodrębnionym z hodowli *Streptomyces griseoplanus* NRRL 3507⁵¹. Natomiast będąc *C*-końcowym aminokwasem tetainy jest odpowiedzialna ze selektywne działanie antybiotyku.



Rys. 6. Specyficzne inhibitory syntazy GlcN-6-P.

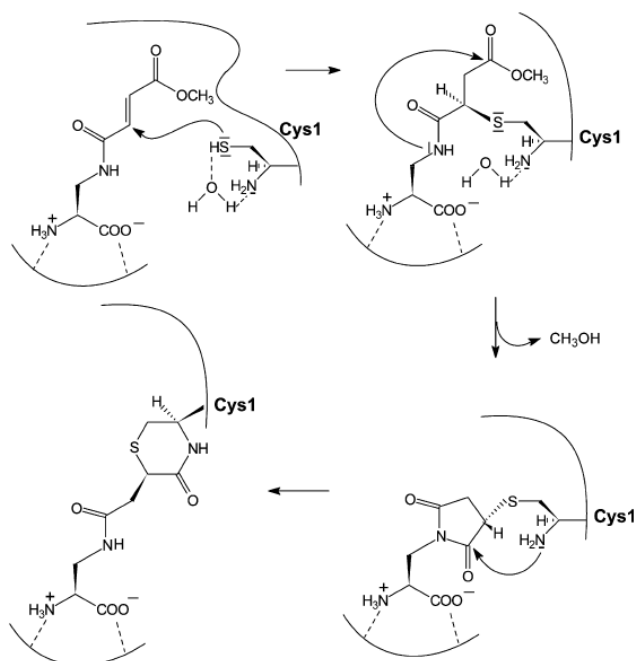
Kolejnym antybiotykiem wykazującym selektywne działanie wobec syntazy GlcN-6-P jest związek o symbolu A 19009⁵², produkowany przez szczep *Streptomyces collinus*⁵³. Dipeptyd A 19009 zbudowany jest z L-alaniny oraz amidu kwasu *N*³-fumaroilo-L-2,3-diaminopropanowego (FCDP)⁵⁴ – właściwego inhibitora enzymu.



Rys. 7. Selektywne inhibitory syntazy GlcN-6-P pochodne kwasu L-2,3-diaminopropanowego.

Prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii badania dotyczące wskazania zależności pomiędzy elementami struktury pochodnych i analogów FCDP, a ich aktywnością inhibicyjną doprowadziły do uzyskania grupy skutecznych i selektywnych inhibitorów syntazy GlcN-6-P^{55,56}. Wśród nich najlepszymi okazały się: kwas *N*³-(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowy (FMDP)⁵⁷, kwas *N*³-(L-2-bromobursztynamolilo)-L-diaminopropanowy (BSDP)^{58,59} oraz kwas *N*³-(LD-*trans*-epoksybursztynamoilo)-L-2,3-diaminopropanowy (EADP) – stanowiący C-końcowy fragment antybiotyku Sch 37137⁶⁰⁻⁶³.

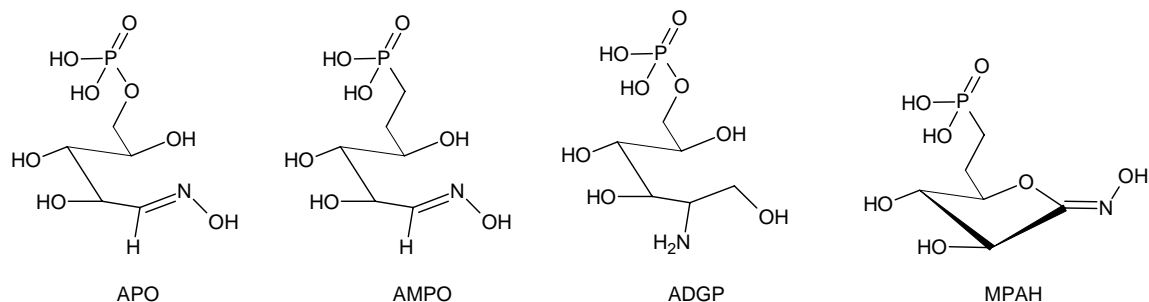
Poznany został mechanizm inhibicji bakteryjnej syntazy GlcN-6-P przez FMDP^{64,65}. W pierwszym etapie następuje addycja Michaela grupy tiolowej Cys1 do podwójnego wiązania węgiel – węgiel inhibitora. Następnie w wyniku ataku amidowego atomu azotu na węgiel karbonylowy grupy estrowej dochodzi do cyklizacji adduktu z utworzeniem pięciocząłowego pierścienia i odejściem cząsteczki metanolu. Powstała w ten sposób pochodna sukcynoimidu ulega przegrupowaniu przy udziale azotu grupy α -aminowej Cys1 do sześciocząłowego 1,4-tiazyn-3-onu. Przedstawiony mechanizm inaktywacji enzymu został potwierdzony metodami chemii teoretycznej z wykorzystaniem modelowania molekularnego oraz mechaniki molekularnej.



Schemat 4. Mechanizm inaktywacji bakteryjnej syntazy GlcN-6-P przez FMDP¹³.

Wśród analogów glutaminy posiadających w swojej strukturze ugrupowanie o charakterze elektrofilowym na uwagę zasługuje L- γ -glutamylo- $\{[(p$ -difluorometylo)fenylo]tio}glicyna⁶⁶. Związek ten zaprojektowano w oparciu o mechanizm działania syntazy GlcN-6-P. Posiada w swojej strukturze latentne ugrupowanie elektrofilowe, którego aktywacja następuje wewnątrz komórki po zhydrolizowaniu wiązania peptydowego.

Inną grupę inhibitorów syntazy GlcN-6-P stanowią analogi stanu przejściowego blokujące domenę wiążącą D-fruktozo-6-fosforan z których najsilniejszymi okazały się analogi strukturalne *cis*-enoloaminy⁶⁷⁻⁷⁰: 2-amino-2-deoksy-D-glucitolo-6-fosforan (ADGP), oksym arabinoso-5-fosforanu (APO) oraz jego metylenofosfonianowa pochodna (AMPO). Silne właściwości inhibicyjne wykazuje również analog fruktozoimino-6-fosforanu: 5-metylenofosfono-D-arabinozohydroksymolakton (MPAH)⁷¹. Analogi strukturalne fruktozo-6-fosforanu nie były rozważane jako potencjalne inhibitory syntazy GlcN-6-P z wyjątkiem 1,2-anhydroheksitolo-6-fosforanu, który w dość nieoczekiwany sposób wiąże się kowalencyjnie z resztą Cys1 enzymu *E.coli*³⁵.



Rys. 8. Inhibitory syntazy GlcN-6-P blokujące domenę izomerazową.

Podjęmowane są również próby poszukiwania nowych inhibitorów syntazy GlcN-6-P przez przeszukanie baz danych znanych związków z wykorzystaniem technik komputerowych i modelowania molekularnego. Wytypowane związki są następnie sprawdzane pod kątem aktywności inhibicyjnej w stosunku do syntazy GlcN-6-P pochodzenia bakteryjnego⁷².

2.3 Transport inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu do komórki patogenicznej

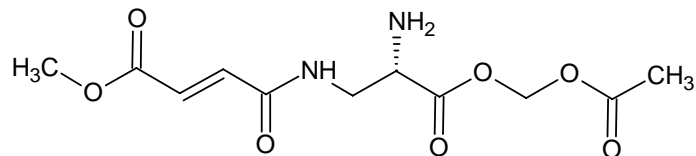
FMDP, EADP i BSDP pomimo, tego iż charakteryzują się bardzo wysoką aktywnością inhibicyjną oraz selektywnością działania w stosunku do syntazy glukozamino-6-fosforanu, pochodzenia zarówno bakteryjnego jak i grzybowego, nie wykazują lub wykazują w niewielkim stopniu zahamowanie wzrostu drobnoustrojów. Związki te będąc niebiałkowymi aminokwasami nie są transportowane przez błonę cytoplazmatyczną przy użyciu permeaz aminokwasowych, białek transportujących aminokwas, wykazujących wysoką specyficzność substratową w stosunku do aminokwasów białkowych⁷³. Problem ten rozwiązano z zastosowaniem koncepcji transportu nośnikowego, wbudowując inhibitor w strukturę peptydu⁷⁴⁻⁷⁷. Peptydy takie były transportowane do komórek za pomocą mniej specyficznych białek transportowych - permeaz peptydowych. Wewnątrz komórki pod wpływem mało specyficznych peptydaz następowała hydroliza enzymatyczna peptydu i uwolnienie inhibitora. Peptydy FMDP wykazywały wysoką aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwrzybiczą. Niestety, pojawienie się oporności wśród patogenów drobnoustrojowych związanej z zanikiem permeaz⁷⁸ peptydowych zmniejszyło skuteczność pochodnych peptydowych. Dodatkowo związki tego typu wykazują niewielką stabilnością w surowicy krwi⁷⁹. Zamiana wiązania amidowego na tioamidowe doprowadziło do otrzymania endotiopeptydów⁸⁰, które charakteryzowały się większą opornością na działanie peptydaz surowicy krwi. Niemniej proces transportu tak zmodyfikowanych peptydów do komórek

drobnoustrojów zachodził wolniej niż peptydów naturalnych⁸¹. Obserwowany rozwój oporności drobnoustrojów na preparaty peptydowe stał się przyczyną poszukiwań nowych inhibitorów syntazy GlcN-6-P transportowanych do komórki inną drogą niż przy użyciu permeaz.

Otrzymane inhibitory syntazy GlcN-6-P (FMDP, EADP i BSDP) ze względu na swoją polarność nie mogą być transportowane do komórki na drodze dyfuzji prostej. Zwiększenie lipofilowości omawianych związków powinno sprzyjać ich penetracji przez błony biologiczne, co poprawi ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. Przykładem związków tego typu są pochodne peptydowe FMDP, w których wolne grupy aminowe acylowano lipofilowymi kwasami organicznymi⁸² lub analogi FMDP w których grupa karboksylowa przeprowadzona została w odpowiednie estry lub amidy⁸³. Zwiększona lipofilowość otrzymanych związków skutkowałą spadkiem ich rozpuszczalności w fizjologicznym pH, co w konsekwencji nie poprawiło ich aktywności biologicznej. Otrzymane też zostały pochodne kwasu L-2,3-diaminopropanowego, w których grupę β -aminową acylowano γ -ketokwasami zawierającymi układ α,β -nienasycony⁸⁴. Związki takie nie posiadają w swojej strukturze ugrupowań łatwo hydrolizujących *in vivo*, takich jak ester metylowy w przypadku FMDP, przez co są stabilniejsze chemicznie.

Kolejnym rozwiązaniem poprawiającym transport inhibitora do komórki jest równoczesne podanie związku zwiększającego przepuszczalność błon biologicznych – takiego jak AMB czy jej pochodna MF-AME. W przypadku FMDP nie zaobserwowano dużego efektu synergistycznego⁸⁵.

Modyfikacje istniejących inhibitorów w kierunku otrzymania związków o zwiększonej lipofilowości zachowujących wysoką aktywność inhibicyjną może być trudne. Związane jest to z faktem, że podstawienie grup funkcyjnych może powodować zmiany konformacyjne inhibitora, uniemożliwiając mu tym samym dostęp do centrum aktywnego i skutkując spadkiem lub utratą aktywności biologicznej. Powszechnie znaną metodą zwiększającą biodostępność leków jest zastosowanie strategii tworzenia „proleków”. Metoda ta polega na przekształceniu związku aktywnego w nietrwale, biodegradowalne pochodne o zwiększonej lipofilowości, które po transporcie do wnętrza komórki na zasadzie dyfuzji, ulegają hydrolizie uwalniając aktywny inhibitor. Wykorzystanie latentnych połączeń np. w postaci estrów acetoksymetylowych czy piwaloiloksymetylowych w celu poprawy farmakokinetyki jest znane w grupie penicylin^{86,87}. Zastosowanie koncepcji estrów latentnych do inhibitorów syntazy GlcN-6-P doprowadziło do otrzymania estru acetoksymetylowego FMDP.

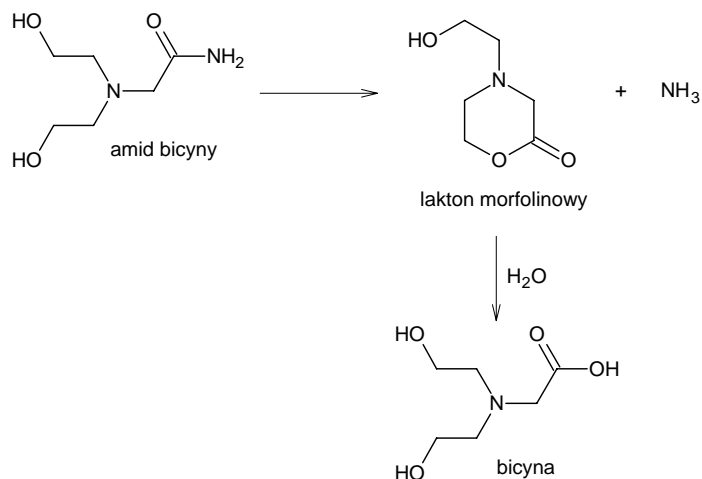


Rys. 9. Ester acetoksymetylowy FMDP.

Związek ten okazał się nie tylko silnym inhibitorem syntazy glukozamino-6-fosforanu, ale także wzrostu komórek drobnoustroju grzybowego, co dowodzi możliwości wprowadzenia inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu do komórek na drodze dyfuzji⁸⁸.

Dalsze modyfikacje FMDP w kierunku zwiększenia lipofilowości poprzez modyfikacje grupy α -aminowej FMDP, z uwagi na jej udział w wiązaniu inhibitora z enzymem wymagają również użycia połączenie nietrwałego, łatwo hydrolizowalnego. Zastosowanie *bis-N,N*-(2-hydroksyetylo)glicyny (bicyny) jako metody transportu związków biologicznie czynnych zawierających wolną grupę aminową zostało zrealizowane dla pochodnych daunorubicyny⁸⁹.

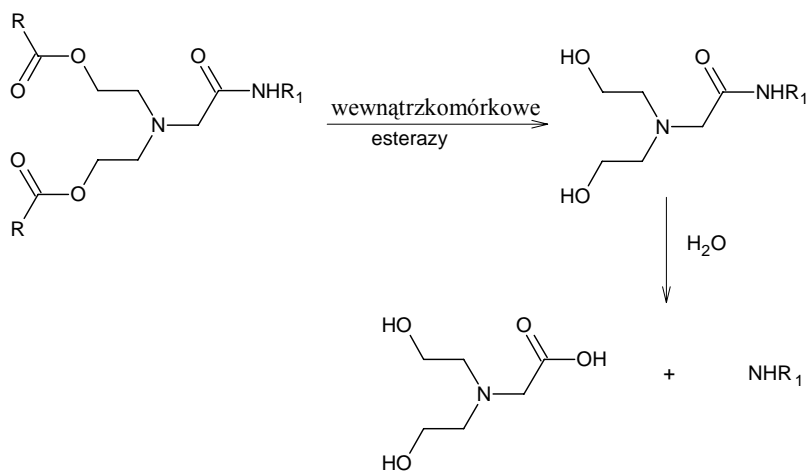
Punktem wyjścia była obserwacja, że pierwszorzędowy amid bicyny w temperaturze 25°C i przy pH = 7 ulega szybko procesowi hydrolizy w porównaniu do amidu glicyny. Czas połowiczny rozpadu amidu bicyny wynosi $t_{1/2} = 3\text{h}$, natomiast dla amidu glicyny mamy $t_{1/2} = 7\text{lat}$ ⁹⁰. Przyspieszenie hydrolizy amidu bicyny spowodowane jest powstaniem cyklicznego laktonu morfolinowego, którego tworzenie jest siłą napędową reakcji.



Schemat 5. Mechanizm reakcji hydrolizy amidu bicyny.

Powyższą obserwację można wykorzystać do utworzenia latentnego połączenia w postaci wiązania amidowego pomiędzy bicyną, a FMDP lub bicyną a estrem acetoksymetylowym FMDP. Szybkie uwalnianie w środowisku wodnym cząsteczki związku biologicznie czynnego z takiego połączenia jest pożądane dopiero wewnątrz komórki. W tej sytuacji konieczna była

estryfikacja grup hydroksylowych bicyny, zwiększająca trwałość układu oraz umożliwiającą w



Schemat 6. Uwalnianie substancji czynnej z amidowej pochodnej bicyny.

szerokim zakresie zmianę właściwości lipofilowych. Dodatkowo obecność trzeciorzędowej grup aminowej w cząsteczce bicyny powinna poprawić rozpuszczalność tych związków. Po transporcie pochodnej bicyny zawierającej inhibitor (NHR₁) do wnętrza komórki, mało specyficzne esterazy powinny hydrolizować wiązania estrowe, a powstający związek ulega szybkiej przemianie uwalniając w przestrzeni wewnątrzkomórkowej substancję czynną.

3. CEL I ZAKRES PRACY

Celem moich badań było zaprojektowanie i synteza: estrów latentnych FMDP, połączeń pomiędzy pochodnymi bityny i FMDP oraz związków zawierających w swojej strukturze pochodne bityny i estry latentne FMDP. Otrzymane związki powinny charakteryzować się zwiększoną lipofilowością w stosunku do wolnego inhibitora przez co zwiększa się ich zdolność do penetracji przez błony biologiczne drobnoustroju grzybowego na drodze dyfuzji prostej.

Największy udział w hydrofilowości FMDP mają grupy karboksylowa i aminowa. W przypadku grupy karboksylowej wykorzystano strategię polegającą na zastosowaniu estrów latentnych (acyloksyalkilowych) jako „proleków”. Połączenia takie są nietrwałe i po penetracji przez błony biologiczne są łatwo hydrolizowane w wyniku działania mało specyficznych esteraz. Z kolei grupa aminowa, z uwagi na fakt, iż jest niezbędna do zachowania powinowactwa związków do centrum aktywnego syntazy glukozamino-6-fosforanu, wymaga również zastosowania połączenia nietrwałego i łatwo biodegradowalnego. Wykorzystanie bityny jako sposobu transportu inhibitora do wnętrza komórki drobnoustrojowej wydaje się być obiecujące i zostało zbadane w przedstawionej pracy. Zaprojektowane połączenia pochodnych bityny i inhibitora charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami lipofilowymi. Dla otrzymanych związków wykonane zostały badania aktywności przeciwbakteryjnej oraz przeciwgrzybiczej. Wyznaczono również parametry lipofilowości oraz określono powinowactwo otrzymanych pochodnych do błon biologicznych przez zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie IAM. Zbadane została również stabilność otrzymanych pochodnych w roztworze wodnym oraz wobec ekstraktu bezkomórkowego z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układach faz odwróconych.

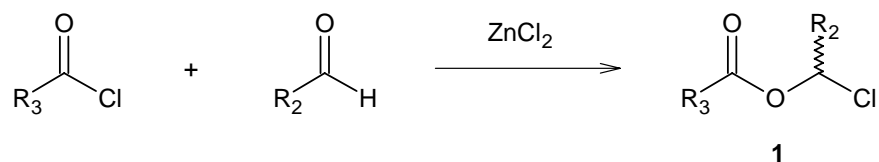
Uzyskane wyniki pozwoliły ustalić, jaki wpływ na aktywność mikrobiologiczną mają podstawniki związane z cząsteczką bityny oraz pomogą określić kierunek dalszych modyfikacji pochodnych FMDP w celu stworzenia skutecznego chemoterapeutyku przeciwgrzybiczego.

4. BADANIA WŁASNE – WYNIKI I DYSKUSJA

4.1 Synteza związków

4.1.1 Synteza estrów 1-chloroalkilowych odpowiednich kwasów

Do syntezy estrów latentnych kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego niezbędne są estry 1-chloroalkilowe odpowiednich kwasów. W literaturze opisana jest synteza estrów 1-chloroalkilowych polegająca na reakcji aldehydów z odpowiednimi chlorkami kwasowymi w obecności bezwodnego ZnCl₂ jako katalizatora⁹¹.



Schemat 7. Synteza estrów 1-chloroalkilowych.

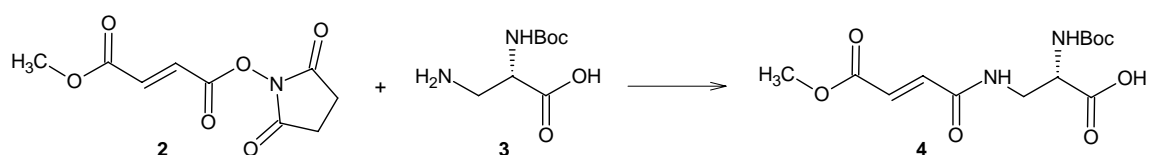
Wykorzystując tą metodę otrzymano szereg estrów 1-chloroalkilowych odpowiednich kwasów **1**, które z mieszaniny poreakcyjnej oczyszczano przez destylację pod normalnym ciśnieniem **1a** lub pod zmniejszonym ciśnieniem **1b-g**.

Nr związku	R	R ₁	t.w./ciśnienie (°C / mmHg)	Wydajność (%)
1a	CH ₃	H	112-114 / 745	55
1b	C(CH ₃) ₃	H	29-30 / 15	49
1c	CH(CH ₃) ₂	H	33-35 / 15	43
1d	C ₆ H ₅ CH ₂	H	120-123 / 1	27
1e	CH(CH ₂ CH ₃) ₂	H	60-63 / 15	51
1f	CH ₃	CH ₃	34-36 / 15	45
1g	CH ₃	CH ₃ CH ₂	38-40 / 15	41

Tabela 1. Zestaw otrzymanych estrów 1-chloroalkilowych.

4.1.2 Synteza kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego

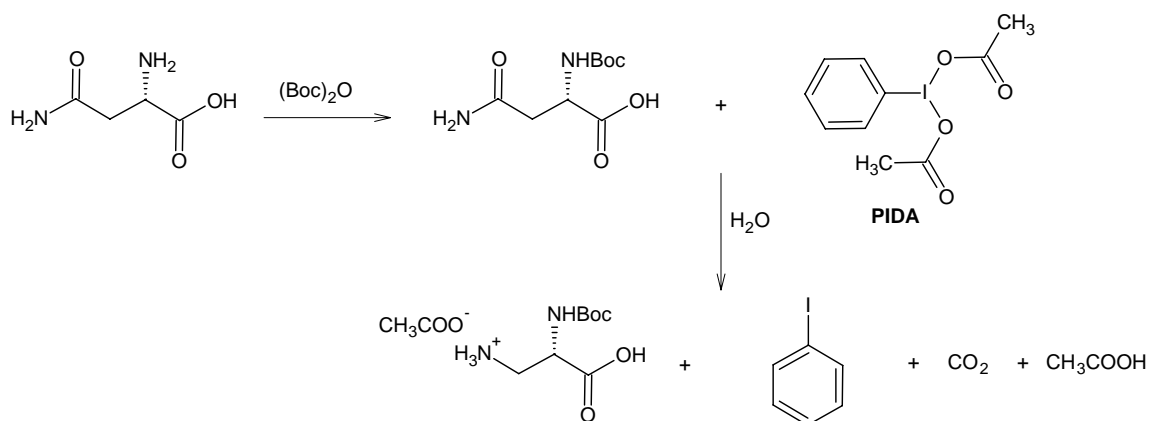
Kwas N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowy (**4**) jest podstawowym substratem w syntezie estrów latentnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (**6**) oraz pochodnych kwasu N^2 -(N,N -2-acyloksyetylo)glicylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (**12**). Związek ten otrzymuje się w wyniku acylowania wolnej grupy aminowej kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowego (**3**) estrem aktywnym N -hydroksysukcynoimidowometylowym kwasu fumarowego⁹² (**2**).



Schemat 8. Synteza kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego.

Reakcję prowadzono przez 24h w temperaturze pokojowej w mieszaninie rozpuszczalników THF-woda. Związek **4** oczyszczono w wyniku krystalizacji z układu octan etylu : eter naftowy.

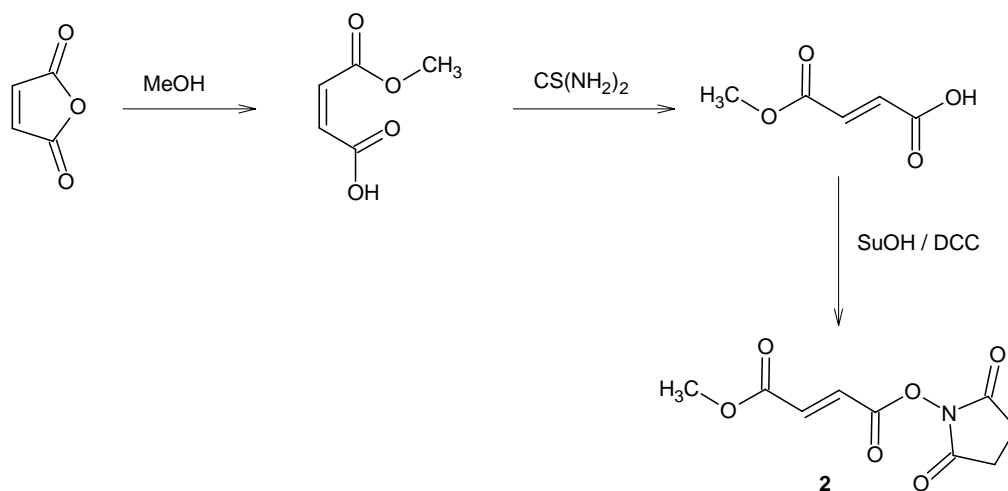
Kwas N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowy, jeden z substratów niezbędnych do syntezy związku **4** otrzymano z L-asparaginy (Schemat 9).



Schemat 9. Synteza kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowego.

W pierwszej kolejności wprowadzono osłonę *tert*-butoksykarbonylową na grupę aminową L-asparaginy za pomocą diwęglanu di-*tert*-butylu⁹³. Następnie w wyniku reakcji przegrupowania Hofmanna realizowanego za pomocą dioctanu jodobenzenu (PIDA) otrzymano kwas *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowy⁹⁴, który wypadł z roztworu w trakcie reakcji. Reakcję prowadzono w mieszaninie rozpuszczalników octanu etylu:acetonitryl:woda. Ubocznym produktem jest jodobenzen, którego pozostałości usuwa się przez 3-krotne przemycie kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowego zimnym octanem etylu. Degradacja ugrupowania amidowego do grupy aminowej przeprowadzona przy użyciu PIDA przebiegała w łagodnych warunkach z dobrą wydajnością.

Kolejnym substratem w syntezie związku **4** jest ester *N*-hydroksysukcynoimidowometylowy kwasu fumarowego (**2**). Ogólny sposób jego otrzymywania został przedstawiony na schemacie 10. W pierwszym etapie w wyniku reakcji bezwodnika maleinowego z alkoholem metylowym otrzymano monoester metylowy kwasu maleinowego z wydajnością ilościową. Reakcję kontrolowano chromatograficznie w układzie 1 prowadzono przez 3h. Następnie monoester metylowy kwasu maleinowego poddano reakcji izomeryzacji pod wpływem katalitycznych ilości tiomocznika do monoestru metylowego kwasu fumarowego. Wypadający z roztworu produkt izomeryzacji krystalizowano z mieszaniny rozpuszczalników benzen : metanol. W ostatnim etapie, otrzymano związek **2** w wyniku sprzęgania monoestru metylowego kwasu fumarowego z *N*-hydroksysukcynoimidem (SuOH), za pomocą dicykloheksylokrbodiimidu (DCC)⁹⁵. Reakcję prowadzono w świeżo przedestylowanym THF początkowo w obniżonej temperaturze (0°C), a następnie w temperaturze pokojowej.

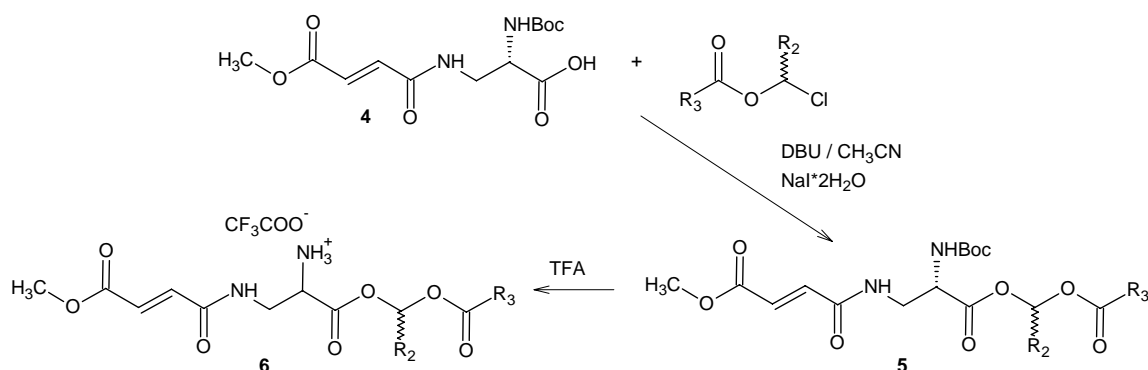


Schemat 10. Synteza estru *N*-hydroksysukcynoimidowometylowego kwasu fumarowego.

Produkt uboczny reakcji, dicykloheksylomocznik (DCU) odsączono. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a oleistą pozostałość krystalizowano z układu octan etylu : heksan.

4.1.3 Syntezy estrów acyloksymetylowych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6)

W literaturze opisana jest synteza estrów latentnych ampicyliny polegająca na reakcji odpowiedniego estru chlorometylowego z pochodną ampicyliny w obecności trietyloaminy oraz NaI^{96,97}. Reakcja prowadzona była w DMF lub acetonie jako rozpuszczalniku. Wykorzystanie tej procedury do estryfikacji kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (4) nie dało oczekiwanego produktu z zadowalającą wydajnością. Inną metodę estryfikacji kwasów halogenkami zaproponował Naboru Ono i wsp. Reakcja prowadzona była w obecności 1,8-diazobicyklo[5.4.0]-undec-7-enu (DBU) w benzenie jako rozpuszczalniku⁹⁸. Zastosowanie tej metody do związku 4 podwyższyło wydajność otrzymanego produktu, ale pojawiły się również zanieczyszczenia o zbliżonym R_f , których usunięcie metodą chromatografii kolumnowej było stosunkowo trudne. W związku z tym zaproponowałem inną metodę syntezy estrów latentnych kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (5). Reakcję prowadziłem w acetonitrylu jako rozpuszczalniku w obecności DBU jako zasady oraz



Schemat 11. Synteza trifluoroocetanów estrów latentnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego.

NaI*2H₂O jako katalizatora. Po usunięciu osłony *tert*-butoksykarbonylowej w wyniku działania bezwodnego TFA⁹⁹ otrzymano trifluorooctany estrów latentnych kwasu *N*³-(4-metoksyfumarilo)-L-2,3-diaminopropanowego (**6**) w postaci amorficznych osadów, które zestawiono w tabeli 2. Nadmiar TFA usunięto przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem.

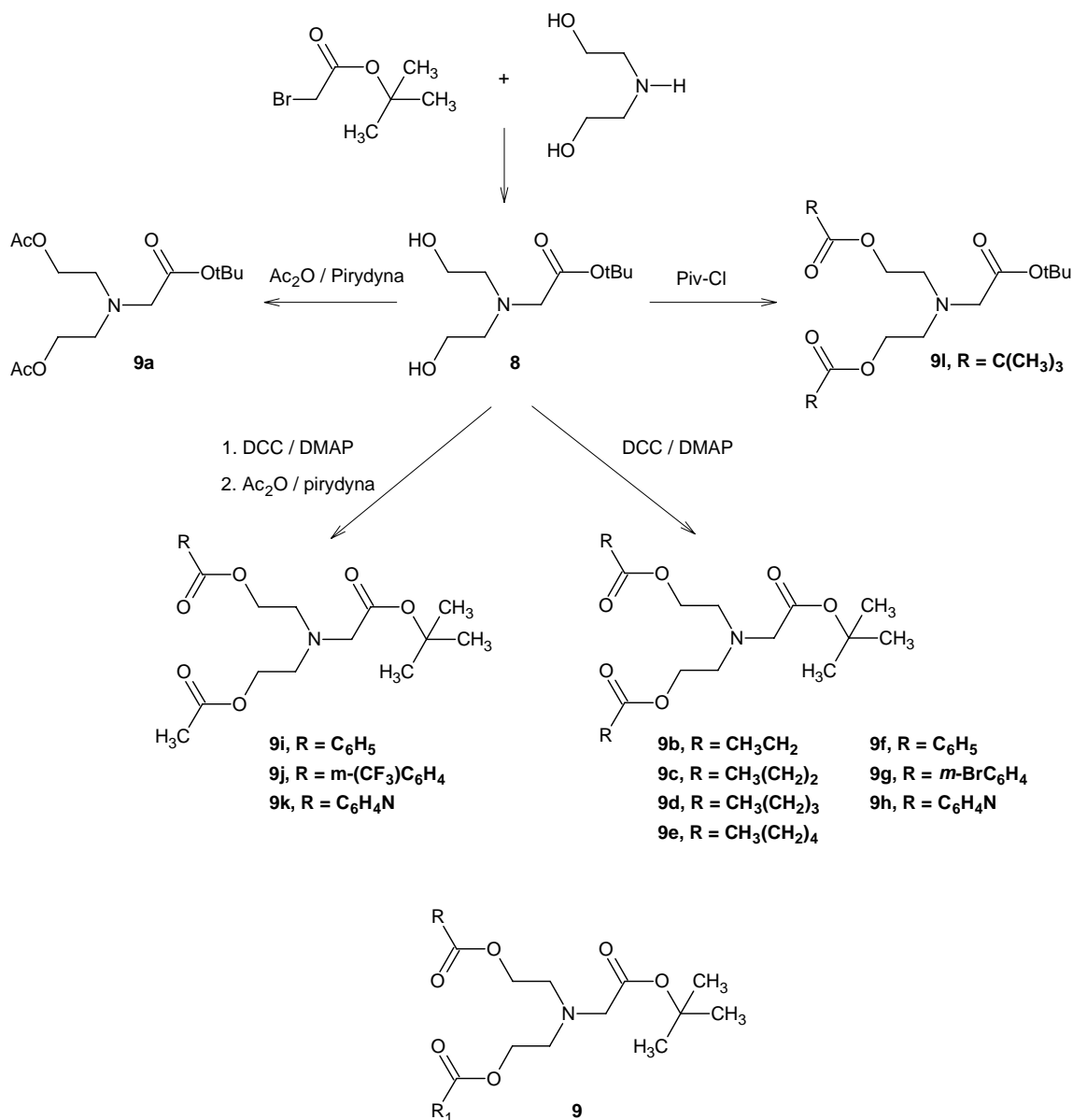
Nr związku	R ₂	R ₃
6a	H	CH ₃
6b	H	C(CH ₃) ₃
6c	H	CH(CH ₃) ₂
6d	H	C ₆ H ₅ CH ₂
6e	H	CH(CH ₂ CH ₃) ₂
6f	CH ₃	CH ₃
6g	CH ₃ CH ₂	CH ₃
6h	CH ₃ CH ₂ O	CH ₃

Tabela 2. Zestawienie otrzymanych estrów latentnych kwasu *N*³-(4-metoksyfumarilo)-L-2,3-diaminopropanowego.

4.1.4 Synteza estrów *tert*-butylowych pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny

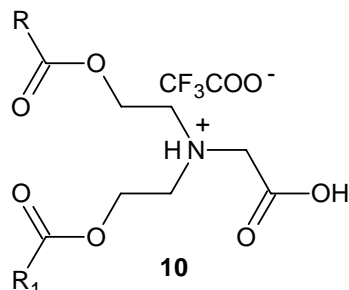
Pierwszym etapem syntezy estrów *tert*-butylowych pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny, jak przedstawiono na schemacie 12, było otrzymanie estru *tert*-butylowego *bis-N,N*-(2-hydroksyetylo)glicyny (**8**)¹⁰⁰. Związek ten otrzymano w wyniku reakcji bromooctanu *tert*-butylu z dietanoloaminą, prowadzonej w bezwodnym chlorku metylenu przez 18h przy 3-krotnym nadmiarze dietanolominy. Ester *tert*-butylowy *bis-N,N*-(2-acetoksyetylo)glicyny (**9a**) otrzymano przez acylowanie grup hydroksylowych związku **8** za pomocą bezwodnika octowego w pirydynie. Natomiast w syntezie pochodnych **9b-h** wykorzystano metodę DCC/DMAP¹⁰¹⁻¹⁰⁵. W przypadku estru *tert*-butylowego

bis-N,N-(2-(2,2-dimetylopropionyloksy)etylo)glicyny (**9i**) wykorzystanie metody DCC/DMAP prowadziło do estryfikacji tylko jednej grupy hydroksylowej estru *tert*-butylowego *bis-N,N*-(2-hydroksyetylo)glicyny (**8**). Z tego względu otrzymanie związku **9i** przeprowadzono poprzez acylowania grup hydroksylowych pochodnej **8** chlorkiem piwaloiilu. Z kolei pochodne **9i-k** otrzymano w dwuetapowej procedurze. W pierwszym etapie jedną grupę hydroksylową związku **8** acylowano przy użyciu metody DCC/DMAP, a drugą używając bezwodnika octowego w pirydynie.



Schemat 12. Synteza estrów *tert*-butylowych pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny.

Ester *tert*-butylowy z pochodnych **10** usunięto w wyniku działania bezwodnego TFA, którego nadmiar, po zakończeniu reakcji, usunięto przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując trifluorooctany pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny.



Rys. 10. Trifluorooctany pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny.

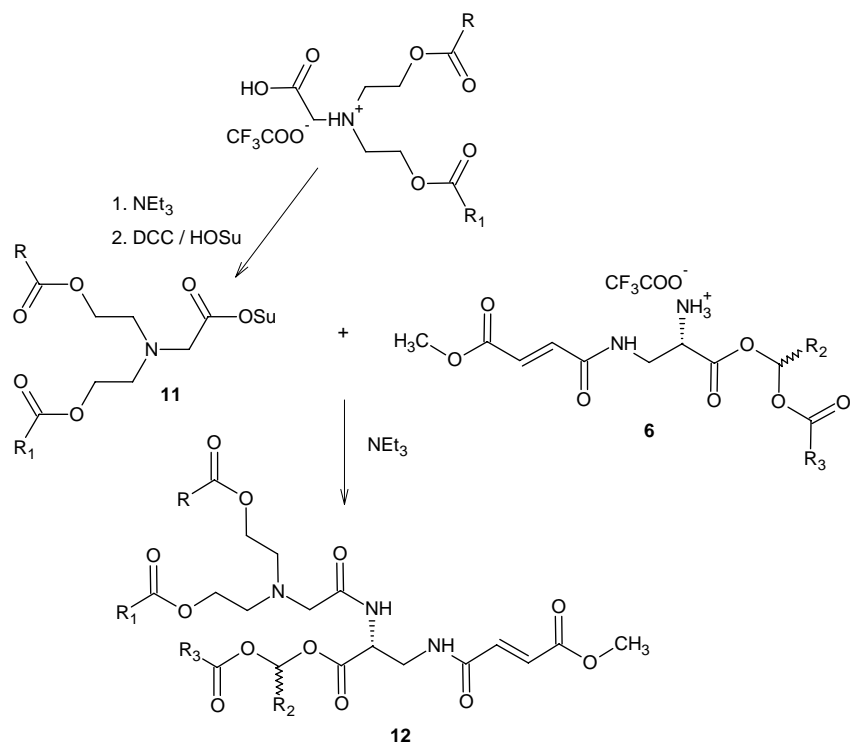
Nr związku	R	R ₁	Nr związku	R	R ₁
10a	CH ₃	CH ₃	10g	<i>m</i> -BrC ₆ H ₄	<i>m</i> -BrC ₆ H ₄
10b	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	10h	C ₆ H ₄ N	C ₆ H ₄ N
10c	CH ₃ (CH ₂) ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂	10i	C ₆ H ₅	CH ₃
10d	CH ₃ (CH ₂) ₃	CH ₃ (CH ₂) ₃	10j	<i>m</i> -CF ₃ C ₆ H ₄	CH ₃
10e	CH ₃ (CH ₂) ₄	CH ₃ (CH ₂) ₄	10k	C ₆ H ₄ N	CH ₃
10f	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	10l	C(CH ₃) ₃	C(CH ₃) ₃

Tabela 3. Zestaw otrzymanych trifluorooctanów pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny.

4.1.5 Synteza estrów acyloksymetylowych kwasu *N*²-(*N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego

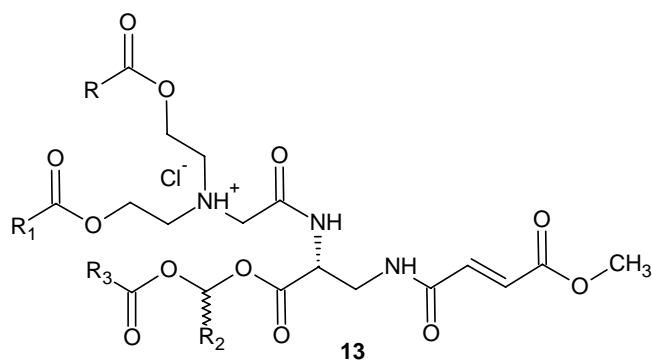
Do tworzenia wiązania amidowego pomiędzy pochodną *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny a estremi latentnymi **6** zastosowano metodę estrów aktywnych, ponieważ w porównaniu z metodą azydową przy użyciu DPPA¹⁰⁶ daje większe wydajność produktu. Zastosowanie metody azydowej prowadzi do powstania śladowych ilości produktu, a jeden z substratów - związku **6** ulegają rozpadowi.

W pierwszym etapie otrzymane zostały *N*-hydroksysukcynoimidowe estry aktywne pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny. Jako odczynnika kondensującego użyto DCC. Estry aktywne **11** zostały bez izolacji użyte do acylowania wolnej grupy aminowej estrów acyloksymetylowych kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (**6**).



Schemat 13. Synteza estrów acetoksymetylowych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroylo)-L-2,3-diaminopropanowego.

Ostatnim etapem było utworzenie chlorowodorków na trzeciorzędowej grupie aminowej bicyny w pochodnych **12**, poprzez dodanie suchego chlorowodoru w eterze dietylowym. Utworzenie chlorowodorków zwiększa rozpuszczalność otrzymanych związków w wodzie, co umożliwiło wykonanie odpowiednich testów aktywności biologicznej.



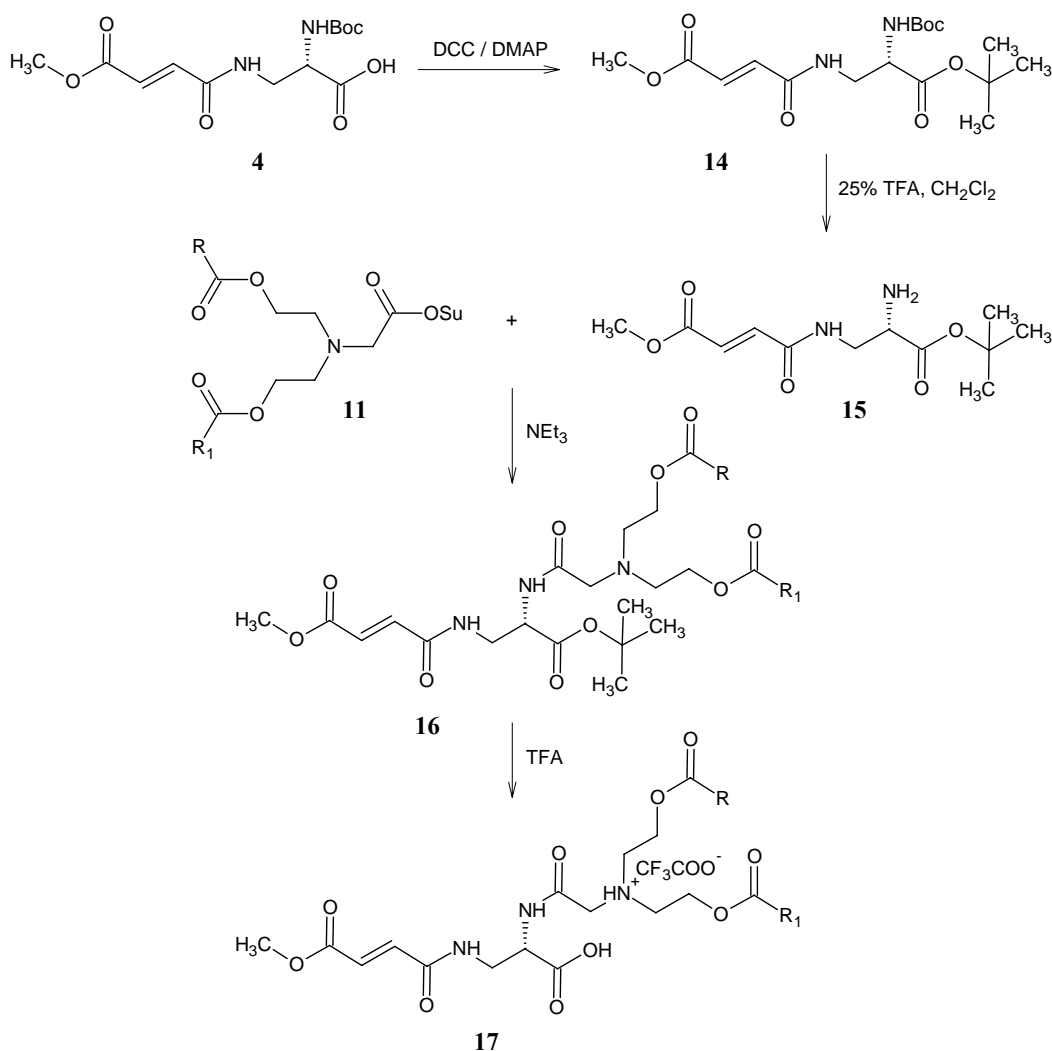
Rysunek 11. Chlorowodorki estrów acyloksymetylowych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroylo)-L-2,3-diaminopropanowego.

Nr związku	R	R ₁	R ₂	R ₃
13a	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
13b	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	H	CH ₃
13c	CH ₃ (CH ₂) ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂	H	CH ₃
13d	CH ₃ (CH ₂) ₃	CH ₃ (CH ₂) ₃	H	CH ₃
13e	CH ₃ (CH ₂) ₄	CH ₃ (CH ₂) ₄	H	CH ₃
13f	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	H	CH ₃
13g	<i>m</i> -BrC ₆ H ₄	<i>m</i> -BrC ₆ H ₄	H	CH ₃
13h	C ₆ H ₄ N	C ₆ H ₄ N	H	CH ₃
13i	C ₆ H ₅	CH ₃	H	CH ₃
13j	<i>m</i> -CF ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H	CH ₃
13k	C ₆ H ₄ N	CH ₃	H	CH ₃
13l	C(CH ₃) ₃	C(CH ₃) ₃	H	CH ₃
13m	CH ₃	CH ₃	H	C(CH ₃) ₃
13n	CH ₃	CH ₃	H	CH(CH ₂ CH ₃) ₂
13o	CH ₃	CH ₃	H	CH(CH ₃) ₂
13p	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ C ₆ H ₅
13r	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
13s	CH ₃	CH ₃	CH ₃ CH ₂	CH ₃
13t	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OCH ₂ CH ₃
13u	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	H	C(CH ₃) ₃
13w	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	H	C(CH ₃) ₃
13v	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	H	CH(CH ₂ CH ₃) ₂

Tabela 4. Zestawienie otrzymanych chlorowodorków estrów acyloksymetylowych pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)- L -2,3-diaminopropanowego.

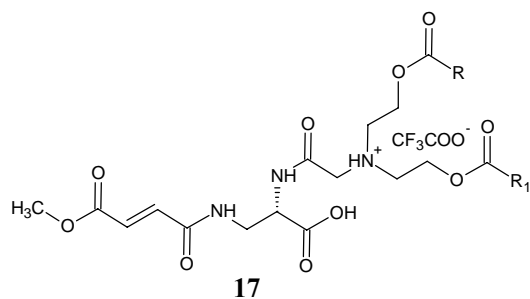
4.1.6 Synteza pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- L -2,3-diaminopropanowego (16)

Do syntezy pochodnych **16** potrzebny był kwas N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- L -2,3-diaminopropanowy z chronioną grupą karboksylową. Do osłony grupy karboksylowej wybrano ester *tert*-butylowy, gdyż w przypadku użycia estru benzyłowego nie jest możliwe jego selektywne usunięcie, metodą katalicznego wodorowania¹⁰⁷, wobec wiązania podwójnego. W pierwszym etapie syntezy związku **14**, przeprowadzono estryfikację grupy



Schemat 14. Synteza trifluorooctanów kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- L -2,3-diaminopropanowego.

karboksylowej pochodnej **4** *tert*-butanolem przy użyciu metody DCC/DMAP otrzymując ester *tert*-butylowy kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (**14**). Następnie konieczne było selektywne usunięcie osłony *tert*-butoksykarbonylowej wobec estru *tert*-butylowego. Obie te osłony są usuwane w wyniku działania suchego TFA, niemniej jednak osłona *tert*-butoksykarbonylowa jest bardziej podatna na acydolityczne odszczepienie. Stosując 25% roztwór bezwodnego TFA w chlorku metylenu, w reakcji kontrolowanej chromatograficznie, selektywnie usunięto osłonę *tert*-butoksykarbonylową grupy aminowej związku **14**, otrzymując ester *tert*-butylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (**14**). W kolejnym etapie acylowano grupę aminową związku **15** estrem aktywnym, *N*-hydroksysukcynimidowym pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny (**11**). Ostatnim etapem było usunięcie estru *tert*-butylowego z pochodnych **16** w wyniku działania bezwodnego TFA. Nadmiar TFA usunięto przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie otrzymane trifluorooctany pochodnych kwasu N^2 -(*N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (**17**) przemyto trzykrotnie zimnym eterem dietylowym.



Rysunek 12. Trifluorooctany kwasu N^2 -(*N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksy-fumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego.

Nr związku	R	R ₁	Nr związku	R	R ₁
17a	CH ₃	CH ₃	17g	<i>m</i> -BrC ₆ H ₄	<i>m</i> -BrC ₆ H ₄
17b	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	17h	C ₆ H ₄ N	C ₆ H ₄ N
17c	CH ₃ (CH ₂) ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂	17i	C ₆ H ₅	CH ₃
17d	CH ₃ (CH ₂) ₃	CH ₃ (CH ₂) ₃	17j	<i>m</i> -CF ₃ C ₆ H ₄	CH ₃
17e	CH ₃ (CH ₂) ₄	CH ₃ (CH ₂) ₄	17k	C ₆ H ₄ N	CH ₃
17f	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	17l	C(CH ₃) ₃	C(CH ₃) ₃

Tabela 5. Zestawienie otrzymanych trifluorooctanów kwasu N^2 -(*N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksy-fumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego.

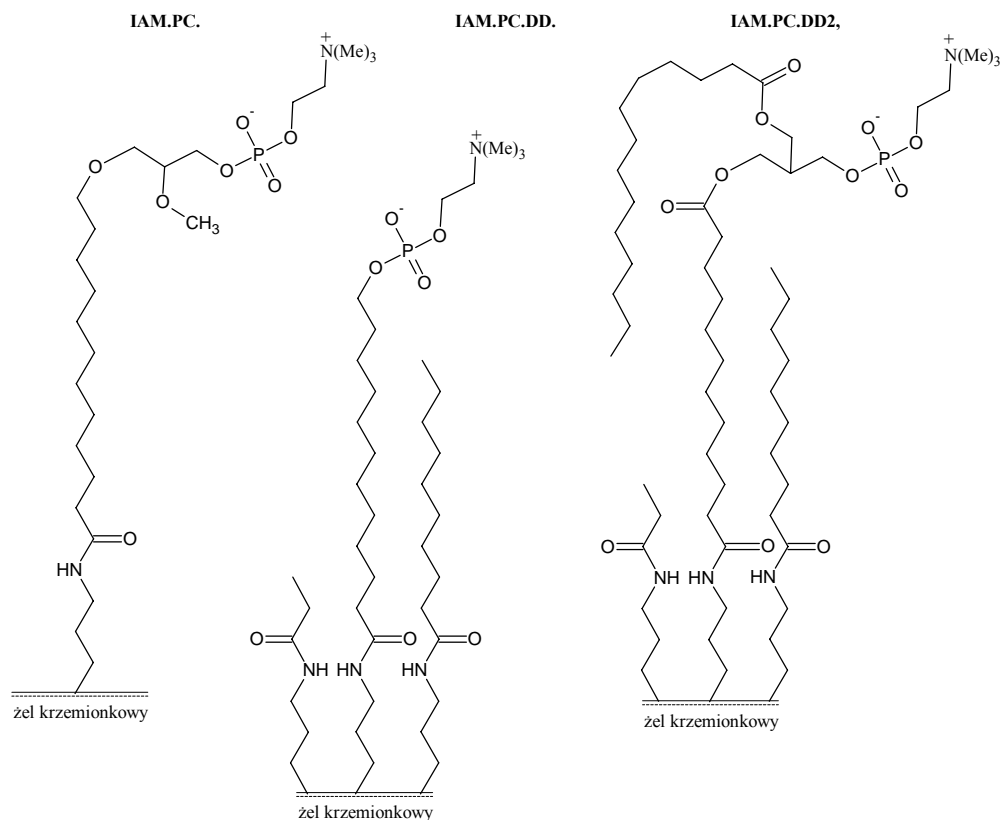
4.2 Określenie powinowactwa pochodnych FMDP do błony biologicznej w oparciu o wysokosprawną chromatografię cieczową na kolumnie IAM

Działanie farmakologiczne potencjalnych chemoterapeutyków uzależnione jest zarówno od procesu transportu związku do komórki (najbardziej pożądana jest dyfuzja bierna) jak również od oddziaływania ze specyficznymi receptorami. Oba te zjawiska zależą od charakteru lipofilowego badanej substancji¹⁰⁸. Dlatego też lipofilowość (hydrofobowość) substancji biologicznie czynnej jest jedną z ważniejszych cech wpływających na własności farmakokinetyczne i farmakodynamiczne związku. Zdolność substancji aktywnej do pokonywania bariery błony biologicznej na drodze dyfuzji prostej jest ściśle związana z lipofilowością związku. Pochodne hydrofilowe, a w szczególności te obdarzone ładunkiem, nie przekraczają łatwo bariery błony biologicznej, natomiast związki silnie hydrofobowe wykazują duże powinowactwo do lipidów znajdujących się w błonie, w związku z czym są akumulowane i nie przedostają się do wnętrza komórki. Z tego powodu parametr lipofilowości stanowi jeden z ważniejszych kryteriów branych pod uwagę podczas projektowania nowych chemoterapeutyków.

Wszystkie oddziaływania występujące pomiędzy roztworem substancji rozpuszczonej a błoną biologiczną charakteryzuje współczynnik podziału (K_m)¹⁰⁹. Wielkość ta opisuje podział substancji między fazę wodną a błonę. Dla związków absorbowanych na drodze biernej dyfuzji współczynnik przenikalności związku przez błonę (P_m) jest wprost proporcjonalny do K_m i opisywany jest zależnością: $P_m = D_m K_m / L$, gdzie: D_m jest współczynnikiem dyfuzji badanego związku przez błonę, a L jest grubością błony biologicznej.

Istnieje wiele metod służących do określenia lipofilowości związku przez wyznaczenie współczynnika podziału. Najprostszą metodą jest badanie substancji w układzie podziałowym dwóch wzajemnie nie mieszających się rozpuszczalników: *n*-oktanol-woda¹¹¹, wprowadzoną przez Hanscha i wsp. Wadą tej metody jest jej pracochłonność i słaba powtarzalność w poszczególnych laboratoriach. Innym sposobem służącym do wyznaczania współczynnika podziału jest wykorzystanie układów liposomalnych, które dobrze oddają charakter oddziaływań związków z błonami biologicznymi. Ograniczenia tej metody wynikają z trudności w przygotowaniu liposomów, określeniu dokładnych stężeń związków wewnątrz pęcherzyków, oraz stosunkowo dużych ilości związków potrzebnych do przeprowadzenia oznaczeń. Obecnie coraz częściej do oznaczania właściwości hydrofobowych związków wykorzystuje się technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układach faz odwróconych (RP) z użyciem oktadecylokrzemionki (ODS). Metoda ta pozwala na

wyznaczenie lipofilowości związku, nie uwzględnia natomiast złożonych interakcji między badanym związkiem, a błona biologiczną. Wszystkich wyżej wymienionych wad pozbawione są badania prowadzone za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układach faz odwróconych z zastosowaniem kolumny IAM^{110,112} (immobilized artificial membrane). Jako fazę stacjonarną, stanowiącą wypełnienie kolumn chromatograficznych IAM stosuje się tzw. immobilizowaną sztuczną membranę. Wypełnienie to stanowi układ modelowy w badaniach farmakokinetyki związków biologicznie czynnych. Podstawowym składnikiem chemicznym złoża jest fosfatydylocholina (fosfolipid naturalnie występujący w błonach komórkowych), która kowalencyjnie związana jest z krzemionką obsadzoną resztami propyloaminowymi. Układ pomiarowy zawierający fazę wodną oraz uporządkowaną warstwę fosfolipidową stanowi model błony biologicznej bardzo zbliżony do błon naturalnych, dzięki czemu jest najbardziej odpowiedni do ilościowej oceny lipofilowości zsyntetyzowanych przez mnie związków chemicznych.



Rys. 13. Struktura chemiczna faz stacjonarnych handlowo dostępnych kolumn chromatograficznych IAM.

Handlowo dostępne są trzy rodzaje kolumn z wypełnieniem IAM różniące się między sobą rodzajem estrów grupy fosforanowej reszty fosfatydylocholiny (rys.13). Do moich badań wybrałem kolumnę IAM.PC.DD 2, która w odróżnieniu od innych kolumn charakteryzuje się dwukrotnie większą liczbą hydrofobowych podstawników na reszcie fosfatydylocholiny, co zdecydowanie wydłuża czas retencji analizowanych związków. Dzięki takiej budowie złoża możliwe jest badanie związków o umiarkowanej lipofilowości, których oddziaływanie z fazą stacjonarną innych kolumn mogłoby być na tyle słabe, że uniemożliwiłoby zaobserwowanie istotnych różnic w ich czasach retencji. Zaletą kolumn z wypełnieniem IAM w przewidywaniu powinowactwa do błon biologicznych jest fakt, że oprócz oddziaływań hydrofobowych uwzględnia się również tworzenie wiązań wodorowych, oddziaływania elektrostatyczne i efekty steryczne¹¹³. Niemniej podczas badania powinowactwa związków do błon biologicznych należy pamiętać, że jest ona zbudowana nie tylko z warstwy fosfolipidowej, ale również z białek, których procentowy udział w błonie może sięgnąć do 80%. Ponadto fosfolipidy tworzące błonę mają różnorodny charakter, czego nie uwzględnia wypełnienie kolumny IAM, zbudowane zazwyczaj z jednego typu fosfolipidów.

W chromatografii cieczonej RP HPLC z kolumną IAM parametrem charakteryzującym lipofilowość związku oraz jego interakcje z błoną biologiczną jest logarytm pojemnościowego współczynnika retencji $\log k'_{IAM}$, który wyraża się wzorem:

$$\log k'_{IAM} = \log \left(\frac{t_R - t_0}{t_0} \right)$$

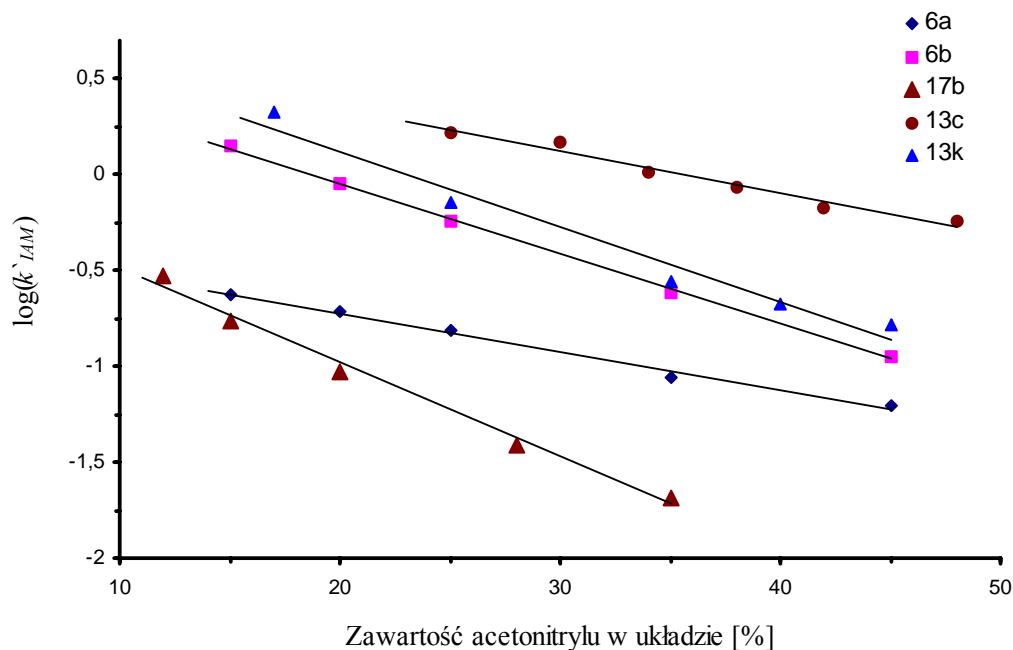
gdzie:

t_0 - martwy czas retencji, wyznaczony dla kwasu cytrynowego

t_R – czas retencji związku

Wielkość ta uzależniona jest od czasu retencji związku (t_r) i charakteryzującego właściwości kolumny tzw. martwego czasu retencji (t_0) substancji nie oddziaływującej z wypełnieniem kolumny dla różnych składów eluenta. Pomiarów dokonano w warunkach, w których jako fazę ruchomą stanowiła mieszanina składająca się z buforu fosforanowo-potasowego (0.1M, pH 7.2) i różnych ilości acetonitrylu (10-50%). Dla każdego związku i dla każdego eluenta oznaczono logarytm pojemnościowego współczynnika retencji $\log k'_{IAM}$, a uśrednione jego wartości wykorzystano do wyznaczenia zależności pomiędzy $\log k'_{IAM}$, a składem eluenta.

Na rys 14. przedstawiono zależność $\log(k'_{IAM})$ od składu fazy ruchomej dla niektórych otrzymanych przeze mnie związków.



Rys. 14. Wykres zależności $\log(k'_{IAM})$ od składu fazy ruchomej.

Zaobserwowano liniową zmianę $\log(k'_{IAM})$ wraz ze zmianą zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej. Dla badanych związków otrzymano wysokie współczynniki korelacji R w zakresie: 9.234-9.534. Następnie przeprowadzono ekstrapolację parametrów retencyjnych, oznaczonych przy różnych składach wodno-organicznej fazy ruchomej, do wartości otrzymanych dla czystego buforu jako hipotetycznej fazy ruchomej ($\log(k'_0)$).

$$\log(k'_{IAM}) = \log(k_0) + bC$$

gdzie:

b - stała liczbowa

C – stężenie rozpuszczalnika organicznego (acetonitrylu) w fazie ruchomej (% v/v)

Uzyskane wartości parametrów charakteryzujących powinowactwo otrzymanych związków zestawiono w tabeli 6.

Symbol związku	log(k ₀)	Symbol związku	log(k ₀)
6a	0.25	13n	1.72
6b	0.56	13o	1.34
6c	0.45	13p	1.76
6d	0.63	13r	1.41
6e	0.74	13s	1.55
6f	0.34	13t	1.26
6g	0.41	13u	1.89
6h	0.46	13w	2.34
13a	0.91	13v	2.25
13b	1.01	17a	0.33
13c	1.36	17b	0.62
13d	1.49	17c	0.84
13e	1.89	17d	1.11
13f	2.11	17e	1.39
13g	2.15	17f	1.73
13h	0.73	17g	1.80
13i	1.42	17h	0.71
13j	1.51	17i	0.94
13k	1.19	17j	1.01
13l	1.94	17k	1.12
13m	1.67	17l	2.01

Tabela 6. Wartości log(k₀) dla otrzymanych związków.

W grupie estrów latentnych FMDP (**6a-h**) zaobserwować można wzrost wartości log(k₀) wraz ze wzrostem objętości reszty estrowej R₃. Związek **6e** zawierający podstawnik 2-etylobutyłowy charakteryzuje się najwyższą w tej grupie pochodnych wartością log(k₀), co wskazuje jego silne powinowactwo do błony biologicznej. Także wprowadzenie podstawnika w pozycję R₂ (metyłowy lub etylowy) poprawia właściwości lipofilowe otrzymanych związków **6f** oraz **6g** w porównaniu ze związkiem **6a** zawierającym w tej pozycji atom wodoru.

Związki **17a-e** wykazują wzrost właściwości hydrofobowych wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w pozycji R. Z kolei wprowadzenie podstawnika benzyłowego, *m*-bromobenzyłowego lub *tert*-butyłowego drastycznie potęguje charakter lipofilowy związków **17f**, **17g** oraz **17l**. Pochodne **17h-j** w których na pozycji R i R₁ znajdują się różne grupy wykazują średnie powinowactwo do błony komórkowej.

W przypadku pochodnych **13a-v** odpowiedni dobór podsawników w pozycjach: R, R₁, R₂ R₃ umożliwił otrzymanie związków wykazujących szeroki zakres zmienności właściwości lipofilowych. Wraz ze wzrostem długości oraz rozgałęzienia podstawników zwiększa się ich powinowactwo do immobilizowanej sztucznej błony. Związki, które wykazują umiarkowane oddziaływanie z błoną biologiczną mogą być transportowane przez tą błonę na drodze dyfuzji biernej.

4.3 Aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza otrzymanych związków

Badania aktywności przeciwbakteryjnej oraz przeciwgrzybiczej zostały wykonane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej przez mgr inż. Izabelę Łącką. Aktywność przeciwgrzybiczą i przeciwbakteryjną nowych związków wyrażono jako MIC, czyli stężenie związku wywołujące przynajmniej 50% zahamowania wzrostu mikroorganizmów w porównaniu do kontroli lub procent zahamowania wzrostu. Badania przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń na mikroplótkach. Dla mikroorganizmów grzybowych zastosowano podłoże YNBG bez aminokwasów i siarczanu amonu zawierającego 2% glukozy i L-prolinę (4 mg/ml), natomiast w przypadku bakterii wykorzystano gotowe podłoże TSB (Tryptic Soy Broth).

4.4.1 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa estrów latentnych kwasu N³-(4-metoksy-fumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego

Symbol związku	MIC ₅₀ [µg/ml]						
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i> DSM 11226	<i>C. tropicalis</i> KKP 334	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>B. subtilis</i>	<i>St. aureus</i> ATCC 6538
6a	2000	1000	1000	500	250	15,6	125
6b	2000	2000	1000	2000	250	62,5	125
6c	2000	2000	>2000	2000	500	125	250
6d	1000	2000	1000	1000	500	125	125
6e	2000	>2000	1000	500	500	125	250
6f	>2000	>2000	1000	2000	1000	250	125
6g	500	2000	1000	1000	500	125	62,5
6h	>2000	>2000	>2000	2000	1000	125	125
FMDP	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

Tabela 7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa estrów latentnych FMDP.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że otrzymane estry latentne wykazują większą aktywność w porównaniu do wolnego FMDP w stosunku do badanych mikroorganizmów. Aktywność ta jest prównywalna dla wszystkich estrów latentnych i w wyraźny sposób nie zależy od lipofilowości związku. Otrzymane pochodne są bardziej aktywne w stosunku do bakterii niż do mikroorganizmów grzybowych.

4.4.2 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego

Symbol związku	MIC ₅₀ [µg/ml]						
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i> DSM 11226	<i>C. tropicalis</i> KKP 334	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>B. subtilis</i>	<i>St. aureus</i> ATCC 6538
17a	>1000	1000	1000	250	>1000	>1000	>1000
17b	>1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000
17c	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
17d	> 500	500	500	125	500	> 500	> 500
17e	> 500	500	500	250	500	500	> 500
17f	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125
17g	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125	125
17h	1000	1000	>1000	1000	1000	1000	500
17i	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500
17j	1000	1000	>1000	1000	1000	1000	500
17k	1000	1000	500	>1000	1000	1000	500
17l	> 500	500	500	250	500	> 500	> 500

Tabela 8. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego.

Pochodne kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego wykazują słabą aktywność przeciwdrobnoustrojową, niemniej aktywność ta jest wyższa niż w przypadku wolnego FMDP. Aktywność w stosunku do mikroorganizmów grzybowych jest nieco wyższa niż dla bakterii.

4.4.3 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa estrów latentnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego

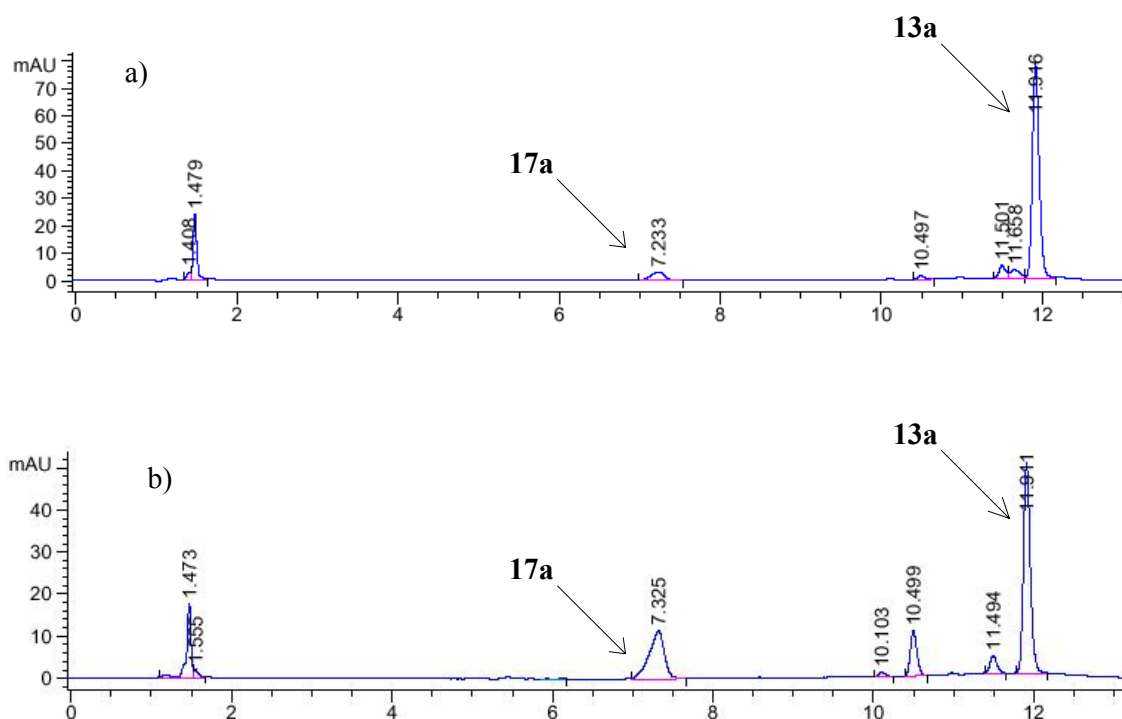
Symbol związku	MIC ₅₀ [µg/ml]						
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i> DSM 11226	<i>C. tropicalis</i> KKP 334	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>B. subtilis</i>	<i>St. aureus</i> ATCC 6538
13a	500	500	1000	1000	1000	1000	>1000
13b	1000	1000	1000	>2000	2000	2000	2000
13c	>1000	1000	500	>1000	>1000	>1000	1000
13d	>250	250	250	>250	>250	>250	>250
13e	>2000	2000	1000	250	>2000	>2000	500
13f	500	125	2000	>2000	500	500	1000
13g	250	125	250	>250	>250	>250	>250
13h	>1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
13i	1000	1000	1000	>1000	1000	1000	1000
13j	>2000	2000	2000	>2000	1000	>2000	2000
13k	>2000	1000	>2000	2000	>2000	2000	>2000
13l	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	500	500
13m	>250	>250	250	250	500	>250	500
13n	31,3	250	250	>500	125	250	1000
13o	250	125	62,5	31,3	125	62,5	250
13p	31,3	125	62,5	250	250	62,5	125
13r	250	>500	500	500	500	>500	>500
13s	62,5	250	250	500	500	>500	500
13t	250	>250	15,6	125	250	250	250
13u	500	1000	500	>500	250	500	500
13w	>1000	>1000	1000	>1000	>100	>1000	>1000
13v	>2000	1000	500	>2000	>2000	1000	1000

Tabela 9. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa estrów latentnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego.

Esty latentne kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego wykazują zróżnicowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Najwyższą wartości IC₅₀ posiadają pochodne **13o** oraz **13p**, tj. ester 2-metylopropionyluksymetylowy oraz fenyloacetoksymetylowy N^2 -(*bis*- N,N -(acetoksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksy-fumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego. W przypadku pochodnych bardziej lipofilowych czynnikiem ograniczającym aktywność biologiczną jest ich słaba rozpuszczalność w wodzie – tak jest dla związków: **13e**, **13g**, **13f**, **13l**, **13u**, **13w**, **13v**.

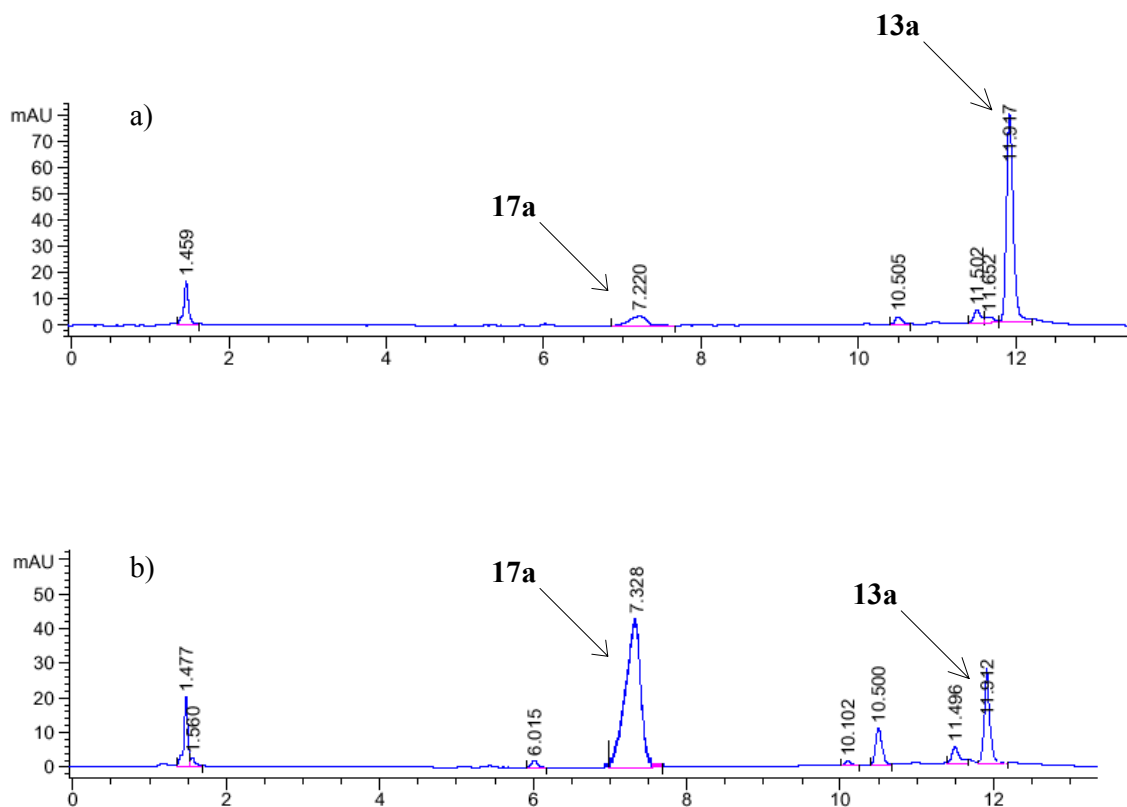
4.4 Ocena trwałości otrzymanych pochodnych

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa otrzymanych pochodnych jest ściśle związana z uwalnianiem FMDP w przestrzeni wewnątrzkomórkowej w wyniku działania niespecyficznego estera. Z tego względu uzasadnione jest przeprowadzenie badań mających na celu ustalenie stopnia hydrolizy zsyntetyzowanych związków w różnych warunkach. Dla związku **13a** oraz **17a** przeprowadzono badanie ich trwałości w roztworze wodnym oraz w obecności ekstraktu bezkomórkowego. Przebieg reakcji obserwowano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych. Dokładny opis doświadczenia umieszczony został w części eksperymentalnej pracy w pkt. 6.9 na str. 85.



Rys.15. Ocena trwałości związku **13a** w środowisku wodnym

a) Chromatogram po upływie 15 min; b) Chromatogram po upływie 8 h.



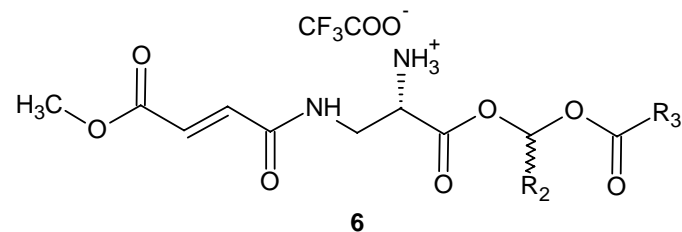
Rys.16. Ocena trwałości związku **13a** w ekstrakcie bezkomórkowym.

a) Chromatogram po upływie 15 min; b) Chromatogram po upływie 8 h.

Zaobserwowano, iż w roztworze wodnym ester acetoksymetylowy w związku **13a** ulega powolnej reakcji hydrolizy przekształcając się w pochodną **17a**. Po upływie 8h stopień hydrolizy wynosi 18%. Natomiast w przypadku ekstaktu bezkomórkowego hydroliza związku **13a** jest znacznie szybsza i po 8h stopień hydrolizy wyniósł 85%. Związek **17a** zarówno w roztworze wodnym jak i w ekstrakcie bezkomórkowym okazał się trwały przez ponad 48h i nie zaobserwowano jego hydrolizy. W związku z czym nie następuje uwalnianie FMDP z pochodnej **17a**, a więc także ze związku **13a**, co prawdopodobnie jest przyczyną niskiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych pochodnych.

4.5 Ogólna charakterystyka otrzymanych związków

4.5.1 Trifluorooctany estrów latentnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego

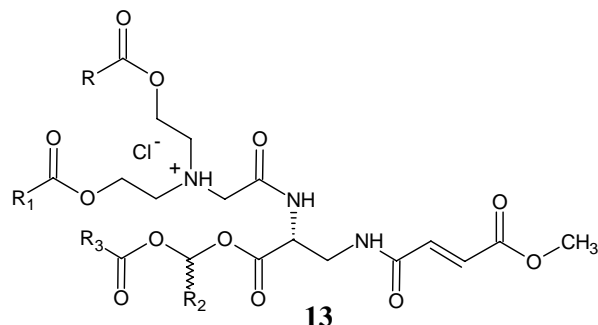


Nr związku	R ₃	R ₂	Wzór sumaryczny	Masa molowa (g/mol)	Układ TLC	R _f	log(k _{IAM})	Wydajność *
6a	CH ₃	H	C ₁₄ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₉	402	1	0.60	0.25	56
6b	C(CH ₃) ₃	H	C ₁₇ H ₂₅ F ₃ N ₂ O ₉	444	1	0.63	0.56	69
6c	CH(CH ₃) ₂	H	C ₁₆ H ₂₇ F ₃ N ₂ O ₉	430	1	0.61	0.45	58
6d	C ₆ H ₅ CH ₂	H	C ₂₀ H ₂₃ F ₃ N ₂ O ₉	478	1	0.63	0.63	63
6e	CH(CH ₂ CH ₃) ₂	H	C ₁₈ H ₂₇ F ₃ N ₂ O ₉	458	1	0.64	0.74	75
6f	CH ₃	CH ₃	C ₁₅ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₉	416	1	0.61	0.34	60
6g	CH ₃	CH ₃ CH ₂	C ₁₆ H ₂₃ F ₃ N ₂ O ₉	430	1	0.64	0.41	53
6h	CH ₃ CH ₂ O	CH ₃	C ₁₆ H ₂₃ F ₃ N ₂ O ₉	446	1	0.63	0.46	51

* - sumaryczna wydajność reakcji syntezy pochodnych **5** oraz usunięcia osłony Boc

Tabela 10. Trifluorooctany estrów latentnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego.

4.5.2 Chlorowodorki estrów acyloksymetylowych pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego



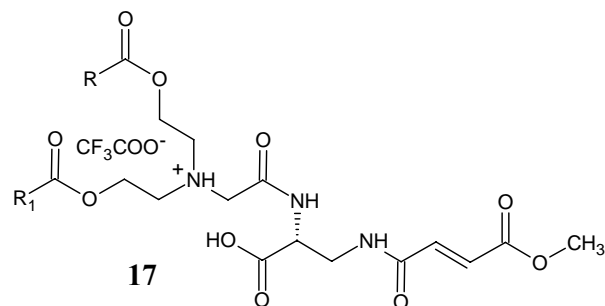
Nr związku	R	R ₁	R ₂	R ₃	Wzór sumaryczny	Masa molowa (g/mol)	Układ TLC	R _f	log(k _{IAM})	Wydajność (%)
13a	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	C ₂₁ H ₃₂ ClN ₃ O ₁₂	554	9	0.14	0.91	41
13b	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	H	CH ₃	C ₂₃ H ₃₆ ClN ₃ O ₁₂	582	9	0.25	1.01	48
13c	CH ₃ (CH ₂) ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂	H	CH ₃	C ₂₅ H ₄₀ ClN ₃ O ₁₂	610	9	0.33	1.36	46
13d	CH ₃ (CH ₂) ₃	CH ₃ (CH ₂) ₃	H	CH ₃	C ₂₇ H ₄₄ ClN ₃ O ₁₂	638	9	0.44	1.49	45
13e	CH ₃ (CH ₂) ₄	CH ₃ (CH ₂) ₄	H	CH ₃	C ₂₉ H ₄₈ ClN ₃ O ₁₂	666	9	0.48	1.89	40
13f	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	H	CH ₃	C ₃₁ H ₃₆ ClN ₃ O ₁₂	678	9	0.41	2.11	41
13g	<i>m</i> -BrC ₆ H ₄	<i>m</i> -BrC ₆ H ₄	H	CH ₃	C ₃₁ H ₃₄ Br ₂ ClN ₃ O ₁₂	836	9	0.43	2.15	35
13h	C ₆ H ₄ N	C ₆ H ₄ N	H	CH ₃	C ₂₉ H ₃₄ ClN ₅ O ₁₂	680	11	0.39	0.73	47
13i	C ₆ H ₅	CH ₃	H	CH ₃	C ₂₆ H ₃₄ ClN ₃ O ₁₂	616	9	0.23	1.42	47
13j	<i>m</i> -CF ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H	CH ₃	C ₂₇ H ₃₃ ClF ₃ N ₃ O ₁₂	684	9	0.26	1.51	40

Tabela 11. Chlorowodorki estrów acyloksymetylowych pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego

Ciąg dalszy Tabeli 11.

Nr związku	R	R ₁	R ₂	R ₃	Wzór sumaryczny	Masa molowa (g/mol)	Układ TLC	R _f	log(k _{IAM})	Wydajność (%)
13k	C ₆ H ₄ N	CH ₃	H	CH ₃	C ₂₅ H ₃₃ ClN ₄ O ₁₂	617	11	0.56	1.19	45
13l	C(CH ₃) ₃	C(CH ₃) ₃	H	CH ₃	C ₂₇ H ₄₄ ClN ₃ O ₁₂	638	9	0.55	1.94	42
13m	CH ₃	CH ₃	H	C(CH ₃) ₃	C ₂₄ H ₃₈ ClN ₃ O ₁₂	596	9	0.57	1.67	52
13n	CH ₃	CH ₃	H	CH(CH ₂ CH ₃) ₂	C ₂₅ H ₄₀ ClN ₃ O ₁₂	610	9	0.47	1.72	43
13o	CH ₃	CH ₃	H	CH(CH ₃) ₂	C ₂₃ H ₃₆ ClN ₃ O ₁₂	582	9	0.39	1.34	40
13p	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₂₇ H ₃₆ ClN ₃ O ₁₂	630	9	0.53	1.76	37
13r	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	C ₂₂ H ₃₄ ClN ₃ O ₁₂	568	9	0.37	1.41	35
13s	CH ₃	CH ₃	CH ₃ CH ₂	CH ₃	C ₂₃ H ₃₆ ClN ₃ O ₁₂	582	9	0.42	1.55	41
13t	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OCH ₂ CH ₃	C ₂₃ H ₃₆ ClN ₃ O ₁₃	598	9	0.44	1.26	38
13u	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	H	C(CH ₃) ₃	C ₂₆ H ₄₂ ClN ₃ O ₁₂	624	9	0.55	1.89	45
13w	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	H	C(CH ₃) ₃	C ₂₄ H ₄₂ ClN ₃ O ₁₂	720	9	0.75	2.34	42
13v	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	H	CH(CH ₂ CH ₃) ₂	C ₂₇ H ₄₄ ClN ₃ O ₁₂	638	9	0.61	2.25	44

4.5.3 Trifluorooctany kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksy-fumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego



Nr związku	R	R ₁	Wzór sumaryczny	Masa molowa (g/mol)	log(k _{IAM})	Wydajność * (%)	t.t. (°C)
17a	CH ₃	CH ₃	C ₂₀ H ₂₉ F ₃ N ₃ O ₁₂	560	0.33	47	99-101
17b	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	C ₂₂ H ₃₃ F ₃ N ₃ O ₁₂	588	0.62	43	90-92
17c	CH ₃ (CH ₂) ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂	C ₂₄ H ₃₇ F ₃ N ₃ O ₁₂	616	0.84	46	86-87
17d	CH ₃ (CH ₂) ₃	CH ₃ (CH ₂) ₃	C ₂₆ H ₄₁ F ₃ N ₃ O ₁₂	645	1.11	40	87-88
17e	CH ₃ (CH ₂) ₄	CH ₃ (CH ₂) ₄	C ₂₈ H ₄₆ F ₃ N ₃ O ₁₂	673	1.39	40	93-94
17f	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	C ₃₀ H ₃₃ F ₃ N ₃ O ₁₂	685	1.73	38	**
17g	<i>m</i> -BrC ₆ H ₄	<i>m</i> -BrC ₆ H ₄	C ₃₀ H ₃₁ Br ₂ F ₃ N ₃ O ₁₂	842	1.80	34	58-59
17h	C ₆ H ₄ N	C ₆ H ₄ N	C ₃₂ H ₃₃ F ₃ N ₅ O ₁₆	915	0.71	38	54-56
17i	C ₆ H ₅	CH ₃	C ₂₅ H ₃₁ F ₃ N ₃ O ₁₂	623	0.94	40	53-55
17j	<i>m</i> -CF ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	C ₂₆ H ₃₀ F ₆ N ₃ O ₁₂	691	1.01	36	**
17k	C ₆ H ₄ N	CH ₃	C ₂₆ H ₃₁ F ₆ N ₄ O ₁₄	738	1.12	38	55-56
17l	C(CH ₃) ₃	C(CH ₃) ₃	C ₂₆ H ₄₁ F ₃ N ₃ O ₁₂	645	2.01	37	142-143

* - sumaryczna wydajność syntezy pochodnej **16** oraz usuwania estru *tert*-butylowego

** - związki otrzymano w postaci amorficznego osadu

Tabela 12. Trifluorooctany kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego

5. STRESZCZENIE I WNIOSKI

Przedmiotem prezentowanej rozprawy doktorskiej są ukierunkowane modyfikacje chemiczne jednego z analogów glutaminy – kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (FMDP) oraz ich wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową. FMDP jest bardzo aktywnym i selektywnym inhibitorem syntazy glukozamino-6-fosforanu. Stwarza to możliwości projektowania nietoksycznych związków o działaniu przeciwgrzybiczym. FMDP będąc niebiałkowym aminokwasem nie jest transportowany do wnętrza komórek za pośrednictwem permeaz aminokwasowych – białek transportujących aminokwasy, które wykazują wysoką specyficzność substratową w stosunku do aminokwasów białkowych. Ponadto, transport związku czynnego przez błony biologiczne z wykorzystaniem odpowiednich permeaz nie jest korzystne, z uwagi na rozwój wśród patogenów grzybowych oporności związanej z zanikiem permeaz peptydowych, które nie są niezbędne dla życia drobnoustrojów. Z tego względu najkorzystniejszą drogą transportu związków do komórki jest transport dyfuzyjny. Niestety, omawiany inhibitor, wykazuje typową dla aminokwasów dużą hydrofilowość i nie może być transportowany do komórki na drodze dyfuzji. Tak więc, wykorzystanie inhibitora syntazy glukozamino-6-fosforanu jako skutecznego chemoterapeutyku przeciwgrzybiczego zależy od modyfikacji chemicznej cząsteczki FMDP w kierunku wzrostu jej lipofilowości, aby możliwy był jej transport dyfuzyjny przez błony biologiczne.

W przypadku grupy α -karboksylowej FMDP zastosowano strategię polegającą na wykorzystaniu estrów latentnych (acyloksyalkilowych) jako „proleków”. Estry te ulegają w warunkach *in vivo* enzymatycznej hydrolizie z jednoczesnym uwolnieniem w pożądanej przestrzeni biologicznej wyjściowego inhibitora enzymatycznego. W wyniku realizacji tego podejścia zaplanowano i opracowano wydajną syntezę estrów latentnych FMDP oraz otrzymano 8 takich pochodnych o zróżnicowanych właściwościach lipofilowych. Dla zsyntetyzowanych związków przeprowadzono badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz ich powinowactwo do błony biologicznej. Wszystkie pochodne wykazują wyższą aktywność zarówno przeciwbakteryjną jak i przeciwgrzybiczą w porównaniu do wolnego FMDP. Aktywność ta jest wyższa w stosunku od bakterii niż mikroorganizmów grzybowych. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy aktywnością biologiczną badanych związków a ich charakterem lipofilowym.

Poprawa właściwości lipofilowych FMDP wymaga również modyfikacji grupy α -aminowej. Z uwagi na fakt, iż wolna grupa aminowa jest niezbędna do zahowania powinowactwa związków do centrum aktywnego syntazy glukozyamin-6-fosforanu konieczne jest utworzenie połączenia nietrwałego. W tym celu wykorzystano obserwację, że pierwszorzędowy amid bicyny w tem. 25°C i przy pH = 7 ulega dużo szybciej procesowi hydrolizy niż amid glicyny. Kowalencyjne wiązanie między grupą karboksylową bicyny, a aminową FMDP powinno ulegać w warunkach fizjologicznych rozpadowi w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, której siłą napędową jest utworzenie sześcioczłonowego laktonu morfolinowego. Dla zwiększenia trwałości takiego połączenia wolne grupy hydroksylowe bicyny przeprowadzono w estry, wykorzystując do tego celu kwasy karboksylowe o różnej budowie chemicznej. Wzrost lipofilowości takich związków powinien sprzyjać procesowi ich dyfuzji do komórek drobnoustrojów. Z kolei obecność trzeciorzędowej grupy aminowej w cząsteczce bicyny poprawi rozpuszczalność otrzymanych związków w roztworach wodnych. Realizując powyższą strategię zaplanowano i otrzymano 12 połączeń *bis-N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny z wolnym FMDP. Związki te posiadają w swojej strukturze zarówno grupę karboksylową jak i aminową (trzeciorzędową), w związku z czym wykazują słabe powinowactwo do błony biologicznej. Badanie trwałości przeprowadzone na przykładzie związku będącego połączeniem *bis-N,N*-(2-acetoksyetylo)glicyny i FMDP pokazało, iż jest on stabilny zarówno w środowisku wodnym jak i w ekstrakcie bezkomórkowym. Wszystkie otrzymane związki z tej grupy wykazują słabą aktywność przeciwdrobnoustrojową, aczkolwiek jest ona nieco wyższa niż dla FMDP. Powodem słabej aktywności biologicznej może być niskie powinowactwo zsyntetyzowanych pochodnych do błony biologicznej, a więc ich słaba penetracja do wnętrza komórki, jak również ich trwałość wobec ekstraktu bezkomórkowego, co wskazuje iż wolny inhibitor nie jest uwalniany z połączenia z *bis-N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyną.

Inną grupą związków zawierających w swojej strukturze zarówno pochodne bicyny jak również FMDP stanowią związki będące połączeniem *bis-N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny z estrami latentnymi FMDP. Otrzymano 22 związki tego typu różniące się między sobą budową oraz właściwościami lipofilowymi. Zaobserwowano, iż aktywność biologiczna nie zależy od rodzaju przyłączonej pochodnej *bis-N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny, natomiast większy wpływ ma rodzaj przyłączonego estru latentnego. Zsyntetyzowane pochodny wykazują umiarkowaną aktywność przeciwdrobnoustojową, niemniej jest ona wyższa niż dla związku macierzystego. Badanie trwałości przeprowadzone na przykładzie związku będącego połączeniem *bis-N,N*-(2-acetoksyetylo)glicyny i estru acetoksymetylowego FMDP pokazało,

iż jest on stabilny w środowisku wodnym, natomiast w obecności ekstraktu bezkomórkowego ester latentny FMDP ulega hydrolizie. Można więc stwierdzić, iż dla pochodnych z tej grupy po penetracji przez błonę biologiczną następuje hydroliza estru latentnego natomiast nie dochodzi do uwolnienia w przestrzeni wewnątrzkomórkowej związku aktywnego – FMDP. Związki zawierające w swojej strukturze podstawniki powodujące duży wzrost lipofilowości są trudno rozpuszczalne w wodzi, co z pewnością obniża ich aktywność biologiczną.

Przedstawione w pracy wyniki mogą być ważne z punktu widzenia racjonalnego projektowania latentnych i lipofilowych związków przeciwgrzybiczych dyfundujących przez błony biologiczne drobnoustroju.

6. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Temperatury topnienia otrzymanych związków zmierzono w kapilarze i nie były one korygowane. Widma ^1H NMR wykonano na aparacie Gemini Varian 200 MHz lub Varian Unity Plus 500 MHz stosując tetrametylosilan jako wzorzec wewnętrzny. Widma ^{13}C NMR wykonano na aparacie Gemini Varian 200 MHz. Oczyszczanie związków przeprowadzono stosując chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym Silica Gel 60 (0.063 – 0.200 mm) firmy Merck. Do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) używano płytek aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowego DC-Alufoalien Kieselgel 60 lub DC-Alufoalien Kieselgel 60 F₂₅₄ firmy Merck. Stosowano następujące układy rozwijające:

- układ 1 - octan etylu : metanol : woda 5 : 1 : 0.75
- układ 2 - octan etylu : eter naftowy 1.5 : 2
- układ 3 - octan etylu : eter naftowy 1 : 2
- układ 4 - octan etylu : eter naftowy 1 : 8
- układ 5 - octan etylu : eter naftowy 1 : 10
- układ 6 - octan etylu : eter naftowy 1 : 12
- układ 7 - octan etylu : eter naftowy 6 : 1
- układ 8 - octan etylu : eter naftowy 1 : 2
- układ 9 - octan etylu : eter naftowy 3 : 1
- układ 10 - octan etylu : eter naftowy 5 : 2
- układ 11 - octan etylu : metanol 10 : 1

Skład układów rozwijających podano w stosunku objętościowym.

Jako odczynniki wywołujące stosowano:

- wywołувacz ninhydrynowy o składzie:
 - 400 mg ninhydryny
 - 200 ml alkoholu metylowego
 - 40 ml kwasu octowego
 - 2 ml kolidyny
- wywołувacz cerowo – molibdenowy o składzie:
 - 3.74 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 1.215 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 6.27 ml stężonego (95-98%) H_2SO_4
 - 83.5 ml H_2O

- wywoływacz siarczanowy o składzie:

300 ml 20% roztworu siarczanu amonu

12 ml stężonego (95-98%) H_2SO_4

6.1 Synteza estrów 1-chloroalkilowych odpowiednich kwasów (1)

6.1.1 Octan chlorometylu (1a)

Do 6.00 g (0.20 mola) paraformaldehydu dodano 15.70 g (0.20 mola) chlorku acetylu oraz katalityczną ilość bezwodnego ZnCl_2 . Całość mieszano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 4h. Po tym czasie przeprowadzono destylację zbierając frakcję wrzącą w temperaturze $108\text{--}114^\circ\text{C}$. Frakcję tą ponownie przedestylowano zbierając produkt wrzący w temperaturze $112\text{--}114^\circ\text{C}$. Otrzymano 11.94 g (0.11 mola) związku **1a** z wydajnością 55%.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 2.15(s, 3H, CH_3); 5.70 (s, 2H, CH_2Cl).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 21.19, 73.45, 165.96.

6.1.2 Ester chlorometylowy kwasu piwalinowego (1b)

Do 5.10 g (0.17 mola) paraformaldehydu dodano 20.49 g (0.17 mola) chlorku kwasu piwalinowego oraz katalityczną ilość bezwodnego ZnCl_2 . Całość mieszano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze łagodnego wrzenia przez 6h. Po tym czasie przeprowadzono destylację próżniową zbierając produkt wrzący w temperaturze $29\text{--}30^\circ\text{C}$ przy 15 mmHg. Otrzymano 12.49 g (83 mmola) związku **1b** z wydajnością 49%.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.23 (s, 9H, $3\times(\text{CH}_3)$); 5.71(s, 2H, CH_2Cl).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 27.12, 39.59, 74.51, 174.45.

6.1.3 Ester chlorometylowy kwasu 2-metylopropanowego (1c)

Do 5.70 g (0.19 mola) paraformaldehydu dodano 20.24 g (0.19 mola) chlorku kwasu 2-metylopropanowego oraz katalityczną ilość bezwodnego ZnCl_2 . Całość mieszano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze łagodnego wrzenia przez 5h. Po tym czasie przeprowadzono destylację próżniową zbierając produkt wrzący w temperaturze $33\text{--}35^\circ\text{C}$ przy 15 mmHg. Otrzymano 11.19 g (82 mmola) związku **1c** z wydajnością 43%.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.16 (d, 6H, $J = 9.4$ Hz, $2\times(\text{CH}_3)$); 2.58-2.66 (m, 1H, CH); 5.71 (s, 2H, CH_2Cl).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 27.12, 39.59, 74.51, 174.45.

6.1.4 Ester chlorometylowy kwasu fenylloctowego (**1d**)

Do 4.80 g (0.16 mola) paraformaldehydu dodano 24.72 g (0.16 mola) chlorku kwasu fenylloctowego oraz katalityczną ilość bezwodnego $ZnCl_2$. Całość mieszano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze łagodnego wrzenia przez 3h. Po tym czasie przeprowadzono destylację próżniową przy użyciu pompy olejowej, zbierając produkt wrzący w temperaturze 120-123°C przy 1 mmHg. Otrzymano 7.93 g (43 mmola) związku **1d** z wydajnością 27%. 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 3.71 (s, 2H, CH_2); 5.71 (s, 2H, CH_2Cl); 7.17-7.30(m, 5H, aromat.) ^{13}C NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 42.03, 73.14, 127.51, 129.38, 131.32, 137.12, 166.85.

6.1.5 Ester chlorometylowy kwasu 2-etylobutanowego (**1e**)

Do 5.70 g (0.19 mola) paraformaldehydu dodano 25.55 g (0.19 mola) chlorku kwasu 2-etylobutanowego oraz katalityczną ilość bezwodnego $ZnCl_2$. Całość mieszano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze łagodnego wrzenia przez 6h. Po tym czasie przeprowadzono destylację próżniową zbierając produkt wrzący w temperaturze 60-63°C przy 15 mmHg. Otrzymano 15.96 g (97 mmoli) związku **1e** z wydajnością 51%.

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 0.91 (t, 6H, $J = 7.2$ Hz, $2x(CH_3)$); 1.42-1.61(m, 4H, $2x(CH_2)$); 2.28 (m, 1H, CH); 5.73 (s, 2H, CH_2Cl).

^{13}C NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 12.31, 24.60, 47.39, 74.21, 172.11.

6.1.6 Octan 1-chloroetylu (**1f**)

Do 8.80 g (0.20 mola) aldehydu octowego ochłodzonego na łaźni lodowej do temperatury -10°C dodano katalityczną ilość bezwodnego $ZnCl_2$, a następnie wkroplono 15.70 g (0.20 mola) chlorku acetylu. Całość mieszano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze łagodnego wrzenia przez 5 h. Po tym czasie przeprowadzono destylację próżniową zbierając produkt wrzący w temperaturze 34-36°C przy 15 mmHg. Otrzymano 11.03 g (90 mmoli) związku **1f** z wydajnością 45%.

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 1.78 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, CH_3); 2.11 (s, 3H, $CH_3C(O)$); 6.55 (q, 1H, $J = 6.6$ Hz, $CHCl$).

^{13}C NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 21.51, 24.75, 77.84, 168.52.

6.1.7 Octan 1-chloropropylu (1g)

Do 9.86 g (0.17 mola) aldehydu propionowego ochłodzonego na łaźni lodowej do temperatury -10°C dodano katalityczną ilość bezwodnego ZnCl_2 , a następnie wkroplono 13.35 g (0.17 mola) chlorku acetylu. Całość mieszano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze łagodnego wrzenia przez 6h. Po tym czasie przeprowadzono destylację próżniową zbierając produkt wrzący w temperaturze $38-40^{\circ}\text{C}$ przy 15 mmHg. Otrzymano 9.56 g (70 mmoli) związku **1g** z wydajnością 41%.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.05 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH_3); 2.03-2.18 (m, 2H, CH_2); 2.12 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 6,36 (m, 1H, CHCl).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.52, 21.35, 32.58, 88.79, 168.21.

6.2 Synteza kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (4)

6.2.1 N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-L-asparagina

18.48 g (0.140 mola) L-asparaginy i 11.76 g (0.140 mola) NaHCO_3 rozpuszczono w 200 ml wody, a następnie wkroplono 30.52 g (0.140 mmola) diwęglanu di-*tert*-butylu rozpuszczonego w 100 ml THF. Całość mieszano przez 15h. Po tym czasie mieszaninę poreakcyjną odparowano do sucha, dodano 200 ml wody i zakwaszono 1 M NaHSO_4 do $\text{pH} = 2$. Wytrącony osad przemyto zimną wodą do pH obojętnego, a następnie dwukrotnie zimnym eterem dietylowym. Otrzymano 20.88 g (0.090 mola) N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-L-asparaginy z wydajnością 64%, t.t. $172-173^{\circ}\text{C}$ (lit.t.t. $174-176^{\circ}\text{C}$).

6.2.2 Kwas N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowy

Do 20.00 g (86.21 mmola) N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-L-asparaginy rozpuszczonej w mieszaninie rozpuszczalników: octan etylu (96 ml), acetonitryl (96 ml) i woda (48 ml), dodano 29.00 g (90.06 mmola) PIDA. Reakcję prowadzono w temperaturze 16°C przez 30 min, a następnie w temperaturze pokojowej przez 4h. Wytrącił się biały osad, który po oziębieniu mieszaniny odsączono i przemyt zimnym octanem etylu. Po osuszeniu otrzymano 9.85 g (48.28 mmola) kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowego, z wydajnością 56%, t.t. $204-205^{\circ}\text{C}$ (lit.t.t. $203-206^{\circ}\text{C}$).

6.2.3 Monoester metylowy kwasu maleinowego

Do 49 g (0.5 mola) bezwodnika maleinowego dodano z wkraplacza zawierającego 16 g (0.5 mola) metanolu około 10% alkoholu. Mieszaninę ogrzano na łaźni wodnej do temperatury 50-55°C intensywnie mieszając, aż do rozpuszczenia bezwodnika. Następnie wkróplono pozostałą część alkoholu. Całość mieszano w temperaturze 50-55°C przez 3h, po czym całość ochłodzono. Otrzymano 65 g (0.5 mola) monoestru metylowego kwasu maleinowego w postaci cieczy.

6.2.4 Monoester metylowy kwasu fumarowego

Do 65,00 g (0.50 mola) monoestru metylowego kwasu maleinowego rozpuszczonego w 65 ml wody dodano 3.10 g (40.79 mmola) tiomocznika. Całość intensywnie mieszano przez 4h, a następnie ochłodzono na łaźni lodowej do temperaturze 5°C. Wytrącony osad monoestru metylowego kwasu fumarowego odsączono i przemyto trzykrotnie zimną wodą. Do przesączu dodano 2.60 g (34.21 mmola) triomocznika, a następnie całość mieszano przez 24h i powtórzono izolację produktu. Uzyskany ester krystalizowano z mieszaniny rozpuszczalników benzen : metanol. Otrzymano 40.30 g (0.31 mola) monoestru metylowego kwasu fumarowego z wydajnością 62 %, t.t. 140-142°C.

6.2.5 Synteza esteru *N*-hydroksysukcynoimidometylowego kwasu fumarowego (2)

Do ochłodzonego na łaźni lodowej (0-5°C) roztworu 9.60 g (73.85 mmola) monoestru metylowego kwasu fumarowego i 8.49 g (73.85 mmola) *N*-hydroksysukcynoimidu rozpuszczonego w 30 ml suchego THF wkróplono 16.73 g (81.21 mmola) DCC rozpuszczonego w 20 ml suchego THF. Reakcję prowadzono przez 16h. Po tym czasie odsączono osad DCU, przesącz zatężono do połowy objętości i pozostawiono w temperaturze 10°C przez 2h. Ponownie usunięto osad DCU, a przesącz odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany olej krystalizowano z mieszaniny rozpuszczalników octan etylu : heksan. Otrzymano 10.88 g (47.93 mmola) związku **2** z wydajnością 65%, t.t. 90-91°C (lit.t.t 93-94°C), TLC w układzie 3, $R_f = 0.55$.

6.2.6 Synteza kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroylo)-*L*-2,3-diaminopropanowego. (6)

Do 9.77 g (47.90 mmoli) kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*L*-2,3-diaminopropanowego i 4.03 g (47.90 mmoli) NaHCO₃ w 15 ml wody, wkróplono 10.88 g (47.92 mmoli) estru *N*-hydroksysukcynoimidometylowego kwasu fumarowego (**2**) rozpuszczonego w 125 ml THF. Po 24h prowadzenia reakcji w temperaturze pokojowej THF odparowano, pozostałość

rozpuszczono w wodzie, a następnie dwukrotnie ekstrahowano eterem dietylowym. Warstwę wodną zakwaszoną do pH = 2 i ekstrahowano octanem etylu dwukrotnie. Warstwy octanowe połączono, suszono bezwodnym MgSO₄, przesączono i odparowano do sucha. Otrzymany olej krystalizowano z układu heksan : octan etylu. Otrzymano 8.78 g (27.79 mmola) związku **6** z wydajnością 58%, t.t. 75-77°C (lit.t.t 74-76°C), TLC w układzie 1, R_f = 0.43.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3.80 (s, 5H, OCH₃, NCH₂); 4.38 (m, 1H, CH); 6.90 (ABq, 2H, J = 15,6 Hz, CH=CH).

6.3 Ogólny sposób syntezy estrów latentnych kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (**6**)

a) Ester latentny kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (**5**).

Do roztworu 2.00 g (6,33 mmola) kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (**4**) w 20 ml acetonitrylu dodano 0.96 g (6.33 mmola) DBU oraz 0.35 g (1.90 mmola) NaJ*2H₂O po czym wkroplono 7.60 mmola estru chloroalkilowego odpowiedniego kwasu. Reakcję prowadzono w temperaturze 65°C pod chłodnicą zwrotną przez 6h. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w octanie etylu. Warstwę organiczną przemyto 1M NaHCO₃, dwukrotnie wodą, a następnie suszono bezwodnym MgSO₄. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym.

b) Ester latentny kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (**6**).

Do 1.03 mmola estru latentnego kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego dodano 3 ml bezwodnego kwasu TFA. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2h po tym czasie nadmiar kwasu TFA odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość przemyto bezwodnym eterem dietylowym. Otrzymany trifluorooctan odpowiedniego estru latentnego kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego przechowywano w eksykatorze próżniowym nad pastylkami wodorotlenku sodu.

6.3.1 Ester acetoksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6a)

a) Ester acetoksymetylowy kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (5a).

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 2. Otrzymano 1.42 g (3.67 mmola) związku 5a z wydajnością 58%, t.t. 84-86°C, TLC w układzie 2, $R_f = 0.25$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.15 (s, 3H, $(\text{O})\text{CCH}_3$); 3.82 (s, 5H, OCH_3 , NCH_2); 4.45(m, 1H, CH); 5.81 (dd, 2H, $J = 5\text{Hz}$, OCH_2O); 6,90 (ABq, 2H, $J = 15\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 21.11, 28.40, 42.90, 51.50, 52.12, 77.71, 80.09, 131.10, 135.20, 154.33, 163.10, 165.21, 168.44, 169.90.

b) Ester acetoksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego(6a).

Otrzymano 0.40 g (1.00 mmola) związku 6a z wydajnością 97%. TLC w układzie 1, $R_f = 0.60$.

6.3.2 Ester piwaloiloksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6b)

a) Ester piwaloiloksymetylowy kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (5b).

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 3. Otrzymano 1.96 g (4.56 mmola) związku 5b z wydajnością 72%. TLC w układzie 2, $R_f = 0.46$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.20 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3.78 (s, 5H, OCH_3 , NCH_2); 4.40 (m, 1H, CH); 5.75 (dd, 2H, $J = 5\text{Hz}$, OCH_2O); 6.86 (ABq, 2H, $J = 15\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 26.65, 28.01, 38.56, 41.12, 47.55, 51.89, 77.85, 81.14, 131.40, 135.89, 155.34, 165.34, 166.17, 166.78, 176.32.

b) Ester piwaloiloksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6b).

Otrzymano 0.44 g (0.99 mmola) związku 6b z wydajnością 96%. TLC w układzie 1, $R_f = 0,63$.

6.3.3 Ester 2-metylopropionyloksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6c)

a) Ester 2-metylopropionyloksymetylowy kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (5c).

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 3. Otrzymano 1.58 g (3.80 mmola) związku 5c z wydajnością 60%. TLC w układzie 2, $R_f = 0.35$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.18 (d, 6H, $J = 6.5\text{Hz}$, $2 \times (\text{CH}_3)$); 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.64 (m, 1H, CH); 3.80 (s, 5H, OCH_3 , NCH_2); 5.75 (dd, 2H, $J = 5\text{Hz}$, OCH_2O); 6.86 (ABq, 2H, $J = 15\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 18.51, 28.03, 32.66, 41.14, 48.65, 51.69, 79.97, 81.70, 131.50, 135.79, 155.66, 165.40, 166.24, 166.94, 175.43.

b) Ester 2-metylopropionyloksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6c).

Otrzymano 0.43 g (1.00 mmola) związku 6c z wydajnością 97%. TLC w układzie 1, $R_f = 0.61$.

6.3.4 Ester fenyloacetoksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6d)

a) Ester fenyloacetoksymetylowy kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (5d).

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 3. Otrzymano 1.91 g (4.11 mmola) związku 5d z wydajnością 65%. TLC w układzie 2, $R_f = 0.44$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3.71 (s, 2H, CH_2); 3.80 (s, 5H, OCH_3 , NCH_2); 4.42 (m, 1H, CH); 5.75 (dd, 2H, $J = 5\text{Hz}$, OCH_2O); 6.86 (ABq, 2H, $J = 15\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}$); 7.32 (m, 5H, aromat.).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 27.95, 40.85, 41.44, 48.37, 51.11, 77.84, 81.89, 127.62, 129.87, 130.54, 131.23, 135.76, 136.46, 155.23, 165.49, 166.48, 166.96, 167.71.

b) Ester fenyloacetoksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6d).

Otrzymano 0.48 g (1.00 mmola) związku 6d z wydajnością 97%. TLC w układzie 1, $R_f = 0.63$.

6.3.5 Ester 2-etylobutyryloksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6e)

a) Ester 2-etylobutyryloksymetylowy kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (5e).

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 3. Otrzymano 2.19 g (4.94 mmola) związek 5e z wydajnością 78%, t.t. 75-76°C, TLC w układzie 2, $R_f = 0.47$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, 6H, $J = 7.4\text{Hz}$, $2x(\text{CH}_3)$); 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.62 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2)$); 2.35 (m, 1H, CH); 3.79 (s, 5H, OCH_3 , NCH_2); 4.42 (m, 1H, CH); 5.78 (dd, 2H, $J = 5.6\text{Hz}$, OCH_2O); 6.88 (ABq, 2H, $J = 15\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 12.44, 24.41, 28.38, 41.32, 48.21, 48.65, 51.77, 79.08, 81.32, 131.54, 135.79, 156.04, 165.78, 166.32, 166.94, 173.97.

b) Ester 2-etylobutyryloksymetylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6e).

Otrzymano 0.46 g (0.99 mmola) związku 6e z wydajnością 96%. TLC w układzie 1, $R_f = 0.64$.

6.3.6 Ester 1-(acetoksy)etylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6f)

a) Ester 1-(acetoksy)etylowy kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (5f).

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 3. Otrzymano 1.60 g (3.99 mmola) związku 5f z wydajnością 63%, t.t. 75-78°C, TLC w układzie 2, $R_f = 0.34$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.77 (d, 3H, $J = 5.3\text{Hz}$, CH_3); 2.11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 3.80 (s, 5H, OCH_3 , NCH_2); 4.45 (m, 1H, CH); 5.75 (m, 1H, OCHO); 6.86 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 20.77, 21.47, 28.34, 41.29, 49.34, 51.79, 77.94, 93.49, 131.56, 135.89, 155.76, 165.73, 166.03, 166.84, 169.26.

b) Ester 1-(acetoksy)etylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (6f).

Otrzymano 0.41 g (0.99 mmola) związku 6f z wydajnością 96%. TLC w układzie 1, $R_f = 0.61$.

6.3.7 Ester 1-(acetoksy)propylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6g)

a) Ester 1-(acetoksy)propylowy N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (5g).

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 3. Otrzymano 1.45 g (3.48 mmola) związku 5g z wydajnością 55%. TLC w układzie 2, $R_f = 0.42$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 0.99 (m, 3H, CH_3); 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.84 (m, 2H, CH_2); 2.11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 3.80 (s, 5H, OCH_3 , NCH_2); 4.45 (m, 1H, CH); 5.65 (m, 1H, OCHO); 6.86 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.94, 21.49, 28.08, 28.55, 41.33, 49.23, 51.59, 78.21, 96.49, 131.66, 135.75, 154.87, 165.45, 165.88, 166.89, 169.14.

b) Ester 1-(acetoksy)propylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6g).

Otrzymano 0.43 g (1.00 mmola) związku 6g z wydajnością 97%. TLC w układzie 1, $R_f = 0.64$.

6.3.8 Ester 1-(etoksykarbonyloksy)etylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (6h)

a) Ester 1-(etoksykarbonyloksy)etylowy kwasu N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (5h)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 3. Otrzymano 1.45 g (3.35 mmola) związku 5h z wydajnością 53%. TLC w układzie 2, $R_f = 0.43$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.35 (m, 3H, CH_3); 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.58 (m, 2H, CH_2); 3.80 (s, 5H, OCH_3 , NCH_2); 4.28 (m, 2H, CH_2); 4.45 (m, 1H, CH); 5.78 (m, 1H, OCHO); 6.86 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$)

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 14.54, 19.82, 28.73, 41.94, 52.67, 54.44, 65.45, 77.71, 93.11, 130.98, 136.39, 154.21, 154.79, 165.80, 166.98, 167.74.

b) Ester 1-(etoksykarbonyloksy)etylowy kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowy (6h).

Otrzymano 0.44 g (0.99 mmola) związku 6h z wydajnością 96%. TLC w układzie 1, $R_f = 0.63$.

6.4 Otrzymywanie estrów *tert*-butylowych pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny (**9**)

6.4.1 Synteza estru *tert*-butylowego *bis-N,N*-(2-hydroksyetylo)glicyny (**8**)

Do 8.64 g (44.31 mmola) bromooctanu *tert*-butylu w 250 ml chlorku metylenu dodano 13.96 g (133.00 mmola) dietanoloaminy. Całość mieszano przez 18h. Po tym czasie mieszaninę poreakcyjną przemyto dwukrotnie 1M NaHCO₃, a następnie dwukrotnie wodą. Warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO₄, przesączono i odparowano. Otrzymano 6.50 g (29.69 mmola) związku **8** z wydajnością 67%. TLC w układzie 1, R_f = 0,70.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2.89 (t, 4H, *J* = 4.4 Hz, 2x(CH₂N)); 3.40 (s, 2H, NH₂C(O)); 3.60 (t, 4H, *J* = 4.4 Hz, 2x(HOCH₂)).

6.4.2 Ester *tert*-butylowy *bis-N,N*-(2-acetyloksyetylo)glicyny (**9a**)

Do 1.20 g (5.48 mmola) estru *tert*-butylowego *bis-N,N*-(2-hydroksyetylo)glicyny (**8**) dodoano 7 ml bezwodnika octowego i 7 ml pirydyny. Całość mieszano przez 15h. Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu, a następnie przemyto trzykrotnie wodą. Warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO₄, przesączono i odparowano. Otrzymano 1.61 g (5.31 mmola) związku **9a** w postaci oleju z wydajnością 97%. TLC w układzie 4, R_f = 0.25.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2.05 (s, 6H, 2x(CH₃C(O))); 3.01 (t, 4H, *J* = 5.8 Hz, 2x(CH₂N)); 3.41 (s, 2H, NH₂C(O)); 4.15 (t, 4H, *J* = 5.8 Hz, 2x(HOCH₂)).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 21.34, 28.56, 56.84, 57.46, 63.21, 81.29, 170.73, 170.85.

6.4.3 Ester *tert*-butylowy *bis-N,N*-(2-propionylksyetylo)glicyny (**9b**)

Do ochłodzonego na łaźni lodowej (0-5°C) roztworu 1.31 g (5.98 mmola) estru *tert*-butylowego *bis-N,N*-(2-hydroksyetylo)glicyny, 0.89 g (11.96 mmola) kwasu propanowego i 0.15 g (1.23 mmola) DMAP w 20 ml chlorku metylenu wkroplono 2.48 g (12.04 mmola) DCC rozpuszczonego w 10 ml chlorku metylenu. Reakcję prowadzono przez 20h. Po tym czasie odsączono osad DCU, przesącz przemyto 1 M NaHCO₃ i wodą. Warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO₄, przesączono i odparowano. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 4. Otrzymano 1.56 g (4.72 mmola) związku **9b** z wydajnością 79%. TLC w układzie 4, R_f = 0.47.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.13 (t, 6H, *J* = 7.5Hz, 2x(CH₃)); 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2.33 (q, 6 H, *J* = 7.5 Hz, 2x(CH₂)); 3.00 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.42 (s, 2H, NH₂C(O)); 4.17 (t, 4H, 2x(C(O)CH₂)).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 9.44, 27.34, 28.32, 55.92, 57.24, 63.56, 81.52, 170.58, 171.45.

6.4.4 Ester *tert*-butylowy *bis-N,N*-(2-butryloksyetylo)glicyny (**9c**)

Otrzymano według procedury opisanej dla estru *tert*-butylowego *bis-N,N*-(2-propionyloksyetylo)glicyny (**9b**). Do reakcji użyto 1.31 g (5.98 mmola) związku **8**, 1.05 g (11.96 mmola) kwasu butanowego, 0.15 g (1.23 mmola) DMAP oraz 2.48 g (12.04 mmola) DCC. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 5. Otrzymano 1.56 g (4.36 mmola) związku **9c** z wydajnością 73% w postaci oleju. TLC w układzie 4, $R_f = 0.61$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 0.94 (t, 6H, $J = 7.4$ Hz, $2x(\text{CH}_3)$); 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.66 (q, 4H, $J = 7.4$ Hz, $2x(\text{CH}_2)$); 2.28 (t, 4H, $J = 7.4$ Hz, $2x(\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))$); 2.98 (t, 4H, $J = 6$ Hz, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.39 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.13 (t, 4H, $J = 6$ Hz, $2x(\text{C}(\text{O})\text{CH}_2)$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 13.82, 18.67, 28.43, 35.97, 56.42, 57.69, 63.31, 81.44, 171.84, 179.73.

6.4.5 Ester *tert*-butylowy *bis-N,N*-(2-pentanoiloksyetylo)glicyny (**9d**)

Otrzymano według procedury opisanej dla estru *tert*-butylowego *bis-N,N*-(2-propionyloksyetylo)glicyny (**9b**). Do reakcji użyto 1.31 g (5.98 mmola) związku **8**, 1.22 g (11.96 mmola) kwasu pentanowego, 0.15 g (1.23 mmola) DMAP oraz 2.48 g (12.04 mmola) DCC. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 6. Otrzymano 1.52 g (3.95 mmola) związku **9d** z wydajnością 66% w postaci oleju. TLC w układzie 4, $R_f = 0.65$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 0.91 (t, 6H, $J = 7.4$ Hz, $2x(\text{CH}_3)$); 1.35 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2)$); 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.60 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2)$); 2.31 (t, 4H, $J = 7.5$ Hz, $2x(\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))$); 2.98 (t, 4H, $J = 5.8$ Hz, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.39 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.14 (t, 4H, $J = 5.8$ Hz, $2x(\text{C}(\text{O})\text{CH}_2)$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 13.64, 22.53, 27.41, 28.41, 34.59, 49.91, 51.77, 64.11, 77.98, 170.23, 173.68.

6.4.6 Ester *tert*-butylowy *bis*-*N,N*-(2-heksanoiloksyetylo)glicyny (**9e**)

Otrzymano według procedury opisanej dla estru *tert*-butylowego *bis*-*N,N*-(2-propionylksoxyetylo)glicyny (**9b**). Do reakcji użyto 1.31 g (5.98 mmola) związku **8**, 1.39 g (11.96 mmola) kwasu heksanowego, 0.15 g (1.23 mmola) DMAP oraz 2.48 g (12.04 mmola) DCC. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 6. Otrzymano 1.51 g (3.65 mmola) związku **9e** z wydajnością 61% w postaci oleju. TLC w układzie 4, $R_f = 0.68$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 0.94 (t, 6H, $J = 6.8\text{Hz}$, $2x(\text{CH}_3)$); 1.29 (m, 8H, $4x(\text{CH}_2)$); 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.69 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2)$); 2.30 (t, 4H, $J = 7.5\text{Hz}$, $2x(\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))$); 2.98 (t, 4H, $J = 5.8\text{ Hz}$, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.39 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.13 (t, 4H, $J = 5.8\text{ Hz}$, $2x(\text{C}(\text{O})\text{CH}_2)$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 13.97, 22.45, 24.87, 28.23, 31.38, 34.38, 49.73, 51.69, 64.04, 77.78, 170.03, 172.47.

6.4.7 Ester *tert*-butylowy *bis*-*N,N*-(2-benzoiloksyetylo)glicyny (**9f**)

Otrzymano według procedury opisanej dla estru *tert*-butylowego *bis*-*N,N*-(2-propionylksoxyetylo)glicyny (**9b**). Do reakcji użyto 1.31 g (5.98 mmola) związku **8**, 1.46 g (11.96 mmola) kwasu benzoowego, 0.73 g (5.98 mmola) DMAP oraz 2.48 g (12.04 mmola) DCC. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 6. Otrzymano 1.48 g (3.47 mmola) związku **9f** z wydajnością 58% w postaci oleju. TLC w układzie 4, $R_f = 0.63$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3.25 (t, 4H, $J = 5.8\text{ Hz}$, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.58 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.46 (t, 4H, $J = 5.8\text{ Hz}$, $2x(\text{C}(\text{O})\text{CH}_2)$); 7.36-7.58 (m, 6H, aromat.); 7.99-8.05 (m, 4H, aromat.).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 28.34, 50.84, 51.32, 64.71, 77.87, 129.12, 130.82, 131.67, 133.21, 164.85, 169.79.

6.4.8 Ester *tert*-butylowy *bis*-*N,N*-(2-(3-bromobenzoiloksy)etylo)glicyny (**9g**)

Otrzymano według procedury opisanej dla estru *tert*-butylowego *bis*-*N,N*-(2-propionylksoxyetylo)glicyny (**9b**). Do reakcji użyto 1.31 g (5.98 mmola) związku **8**, 2.40 g (11.96 mmola) kwasu 3-bromobenzoowego, 0.73 g (5.98 mmola) DMAP oraz 2.48 g (12.04 mmola) DCC. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 6. Otrzymano 1.68 g (2.87 mmola) **9g** z wydajnością 48% w postaci oleju. TLC w układzie 4, $R_f = 0.65$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3.18 (t, 4H, $J = 5.8$ Hz, $2\times(\text{CH}_2\text{N})$); 3.51 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.41 (t, 4H, $J = 5.8$ Hz, $2\times(\text{C}(\text{O})\text{CH}_2)$); 7.23-8.12 (m, 8H, aromat.).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 28.47, 50.82, 51.47, 64.34, 77.73, 122.64, 127.69, 130.52, 132.05, 135.74, 162.34, 169.83.

6.4.9 Ester *tert*-butylowy *bis-N,N*-(2-*nikotyno*iloksyetylo)glicyny (**9h**)

Otrzymano według procedury opisanej dla estru *tert*-butylowego *bis-N,N*-(2-propionyloksyetylo)glicyny (**9b**). Do reakcji użyto 1.31 g (5.98 mmola) związku **8**, 1.47 g (11.96 mmola) kwasu nikotynowego, 1.46 g (11.96 mmola) DMAP oraz 2.48 g (12.04 mmola) DCC. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą octan etylu. Otrzymano 1.31 g (3.05 mmola) związku **9h** z wydajnością 51% w postaci oleju. TLC w octanie etylu, $R_f = 0.40$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.36 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3.25 (t, 4H, $J = 6.0$ Hz, $2\times(\text{CH}_2\text{N})$); 3.44 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.46 (t, 4H, $J = 6.0$ Hz, $2\times(\text{C}(\text{O})\text{CH}_2)$); 7.27-9.10 (m, 8H, aromat.).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 28.34, 50.84, 51.11, 64.48, 77.98, 122.47, 124.43, 134.91, 148.22, 151.89, 160.83, 169.85.

6.4.10 Ester *tert*-butylowy *N*-(2-(*acetyloksy*)etylo)-*N*-(2-(*benzo*iloksy)etylo)glicyny (**9i**)

Do ochłodzonego na łaźni lodowej (0-5°C) roztworu 1.31 g (5.98 mmola) estru *tert*-butylowego *bis-N,N*-(2-hydroksyetylo)glicyny (**8**), 0.73 g (5.98 mmola) kwasu benzoowego, 0.11 g (0.90 mmola) DMAP w 20 ml chlorku metylenu wkroplono 1.23 g (5.98 mmola) DCC rozpuszczonego w 10 ml chlorku metylenu. Reakcję prowadzono przez 20h. Po tym czasie odsączono osad DCU, przesącz przemyto 1 M NaHCO_3 i wodą. Warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO_4 , przesączono i odparowano. Do pozostałości dodano 5 ml bezwodnika octowego i 5 ml pirydyny. Całość mieszano przez 15h. Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 4. Otrzymano 1.20 g (3.29 mmola) związku **9i** z wydajnością 55% w postaci oleju. TLC w układzie 4, $R_f = 0.37$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.00 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 3.04 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2N); 3.13 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2N); 3.45 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.15 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$); 4.39 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$); 7.39-7.56 (m, 3H, aromat.); 8.00-8.06 (m, 2H, aromat.).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 21.11, 28.42, 55.91, 57.23, 58.35, 62.47, 81.52, 129.34, 131.52, 133.06, 164.85, 170.21, 171.97.

6.4.11 Ester *tert*-butylowy *N*-(2-(acetyloksy)etylo)-*N*-(2-(3-(trifluorometylo)benzoilo-ksy)etylo)glicyny (**9j**)

Otrzymano według procedury opisanej dla pochodnej **9i**. Do reakcji użyto 1.31 g (5.98 mmola) związku **8**, 1.14 g (5.98 mmola) kwasu 3-(trifluorometylo)benzoesowego, 0.15 g (1.23 mmola) DMAP oraz 2.48 g (12.04 mmola) DCC. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 4. Otrzymano 1.29 g (2.99 mmola) związku **9j** z wydajnością 50% w postaci oleju. TLC w układzie 4, $R_f = 0.37$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 3.05 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2N); 3.16 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2N); 3.46 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.16 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$); 4.44 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$); 7.55-8.30 (m, 4H, aromat.);

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 21.11, 28.39, 53.25, 57.07, 58.04, 62.41, 82.09, 114.49, 125.81, 129.23, 129.41, 130.50, 132.27, 162.09, 170.21, 171.45.

6.4.12 Ester *tert*-butylowy *N*-(2-(acetyloksy)etylo)-*N*-(2-(nikotynoiloksy)etylo)glicyny (**9k**)

Otrzymano według procedury opisanej dla pochodnej **9i**. Do reakcji użyto 1.31 g (5.98 mmola) związku **8**, 0.74 g (5.98 mmola) kwasu nikotynowego, 0.73 g (5.98 mmola) DMAP oraz 2.48 g (12.04 mmola) DCC. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 7. Otrzymano 1.27 g (3.47 mmola) związku **9k** z wydajnością 58%. TLC układzie 7, $R_f = 0.71$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.33 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.03 (s, 3H, $2 \times (\text{CH}_3\text{C}(\text{O}))$); 3.21 (t, 4H, $J = 6.0$ Hz, $2 \times (\text{CH}_2\text{N})$); 3.47 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.43 (t, 4H, $J = 6.0$ Hz, $2 \times (\text{C}(\text{O})\text{CH}_2)$); 7.23-9.05 (m, 4H, aromat.).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 20.25, 28.33, 55.91, 57.32, 58.41, 62.43, 80.97, 122.17, 124.59, 134.92, 148.47, 151.90, 159.64, 170.64, 171.58.

6.4.13 Ester *tert*-butylowy *bis-N,N*-(2-(2,2-dimetlopropionyloksy)etylo)glicyny (**9I**)

Do ochłodzonego na łaźni lodowej (0-5°C) roztworu 1.31 g (5.98 mmola) estru *tert*-butylowego *bis-N,N*-(2-hydroksyetylo)glicyny (**8**), 1.21 g (12.00 mmola) trietyloaminy w 20 ml chlorku metylenu wkroplono 1.44 g (12.00 mmola) chlorku piwaloilu. Reakcję prowadzono przez 16h. Po tym czasie mieszaninę poreakcyjną odparowano. Pozostałość rozpuszczono w octanie etylu, przemyto 1 M NaHCO₃ i dwukrotnie wodą. Warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO₄, przesączono i odparowano. Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 6. Otrzymano 1.69 g (4.36 mmola) związku **9I** z wydajnością 73%. TLC w 4, R_f = 0.80.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1.45 (s, 18H, 2x(C(CH₃)₃)); 3.01 (t, 4H, *J* = 5.8 Hz, 2x(CH₂N)); 3.41 (s, 2H, NH₂C(O)); 4.15 (t, 4H, *J* = 5.8 Hz, 2x(HOCH₂)).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 27.09, 28.45, 41.25, 50.27, 51.56, 64.78, 78.34, 170.39, 174.68.

6.5 Ogólny sposób syntezy chlorowodorków estrów acyloksymetylowych kwasu *N*²-(*N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksyfumaroilo)-*L*-2,3-diaminopropanowego (**13**)

a) Otrzymywanie pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny

Do 1.00 mmola estru *tert*-butylowego *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny dodano 3 ml bezwodnego TFA. Reakcję acydolizy prowadzono przez 12h, po tym czasie nadmiar TFA usunięto przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość przemyto bezwodnym eterem dietylowym. Otrzymano 0.99 mmola trifluorooctanu odpowiedniej pochodnej *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny.

b) Otrzymywanie estrów *N*-hydroksysukcynoimidowych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny (**11**).

Do ochłodzonego na łaźni lodowej (0-5°C) roztworu 0.99 mmola trifluorooctanu *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny dodano 0.20 g (2.00 mmola) trietyloaminy i 0.114 g (0.99 mmola) *N*-hydroksysukcynoimidu w 10 ml suchego THF, a następnie wkroplono 0.216 g (1.05 mmola) DCC rozpuszczonego w 8 ml suchego THF. Po 24h odsączono osad DCU. Otrzymany surowy ester *N*-hydroksysukcynoimidowy pochodnych *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny użyto w następnym etapie syntezy.

c) Otrzymywanie estrów latentnych kwasu N^2 -(*N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (**12**).

Do ochłodzonego na łaźni lodowej (0-5°C) roztworu 1.00 mmola trifluorooctanu estru latentnego kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (**6**) w 7 ml suchego THF dodano 0.165 g (1.50 mmola) trietyloaminy i odpowiedniego esteru *N*-hydroksysukcynoimidowego *N,N*-(2-acyloksyetylo)glicyny (**11**). Reakcję prowadzono przez 24 h. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w octanie etylu, przemyto 1M NaHCO₃ i dwukrotnie wodą. Warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO₄, przesączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt reakcji oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym.

d) Otrzymywanie chlorowodorki estrów latentnych kwasu N^2 -(*N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (**13**).

Odpowiedni ester acetoksymetylowy kwasu N^2 -(*N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (**12**) rozpuszczono w octanie etylu, a następnie dodano równomolową ilość 2.01 M suchego chlorowodoru w eterze dietylowym. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano chlorowodorki odpowiednich esterów acyloksymetylowych kwasu N^2 -(*N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (**13**) z ilościową wydajnością w postaci amorficznego osadu.

6.5.1 Chlorowodorek esteru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(*bis-N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (13a**)**

Związek **12a** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.212 g (0.41 mmola) produktu **13a** z wydajnością 41%. TLC w układzie 9, R_f = 0.14.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 2.09 (s, 6H, 2x(CH₃C(O))); 2.12 (s, 3H, CH₃C(O)); 2.88 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3,31 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz, NCH₂C(O)); 3.78 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.10-4.35 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.70 (m, 1H, NHCH); 5.75 (dd, 2H, *J* = 5,6Hz, OCH₂O); 6.90 (ABq, 2H, *J* = 15.4 Hz, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 21.21, 21.44, 42.77, 51.32, 52.76, 56.80, 57.80, 63.45, 78.11, 131.45, 134.82, 163.43, 165.01, 168.77, 169.73, 170.92, 171.74.

6.5.2 Chlorowodorek esteru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-propionyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- L -2,3-diaminopropanowego (13b)

Związek **12b** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.261 g (0.48 mmola) produktu **13b** z wydajnością 48%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.25$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.13 (t, 6H, $J = 7.5$ Hz, $2 \times (\text{CH}_3)$); 2.12 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 2.36 (q, 4H, $J = 7.5$ Hz, $2 \times (\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))$); 2.88 (m, 4H, $2 \times (\text{CH}_2\text{N})$); 3.29 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.78 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.15-4.35 (m, 4H, $2 \times ((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.70 (m, 1H, NHCH); 5.75 (dd, 2H, $J = 5.6$ Hz, OCH_2O); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 9.52, 21.31, 21.57, 42.45, 51.87, 52.97, 56.40, 57.92, 63.55, 77.78, 131.07, 135.47, 163.63, 165.39, 168.22, 170.04, 170.83, 171.32.

6.5.3 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-butyryloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- L -2,3-diaminopropanowego (13c)

Związek **12c** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.263 g (0.46 mmola) produktu **13c** z wydajnością 46%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.33$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 0.94 (t, 6H, $J = 7.3$ Hz, $2 \times (\text{CH}_3)$); 1.64 (m, 4H, $2 \times (\text{CH}_2)$); 2.12 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 2.32 (t, 4H, $J = 7.5$ Hz, $2 \times (\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))$); 2.89 (t, 4H, $J = 5.6$ Hz, $2 \times (\text{CH}_2\text{N})$); 3.31 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.78 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.14-4.30 (m, 4H, $2 \times ((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.72 (m, 1H, NHCH); 5.76 (dd, 2H, $J = 5.6$ Hz, OCH_2O); 6.88 (ABq, 2H, $J = 15.4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 12.16, 18.05, 21.67, 34.48, 42.01, 51.52, 52.64, 56.92, 58.11, 63.88, 77.49, 131.54, 135.21, 163.84, 165.28, 168.47, 170.43, 171.11, 171.78.

6.5.4 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-pentanoiloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)- L -2,3-diaminopropanowego (13d)

Związek **12d** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 10. Po utworzeniu soli otrzymano 0.270 g (0.45 mmola) produktu **13d** z wydajnością 45%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.44$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 0.92 (t, 6H, $J = 7.5$ Hz, $2 \times (\text{CH}_3)$); 1.36 (m, 4H, $2 \times (\text{CH}_2)$); 1.61 (m, 4H, $2 \times (\text{CH}_2)$); 2.14 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 2.35 (t, 4H, $J = 8.0$ Hz, $2 \times (\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))$); 2.86 (m, 4H, $2 \times (\text{CH}_2\text{N})$); 3.28 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.80 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2).

4.15-4.28 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.73 (m, 1H, NHCH); 5.76 (dd, 2H, *J* = 5.5 Hz, OCH₂O); 6.86 (ABq, 2H, *J* = 15.5 Hz, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 13.89, 21.56, 21.98, 27.13, 34.72, 42.87, 51.13, 52.79, 57.28, 58.43, 63.47, 77.87, 132.08, 135.67, 163.51, 165.87, 168.64, 170.11, 171.46, 171.64.

6.5.5 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu *N*²-(*bis-N,N*-(2-heksanoilo-ksyetylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (13e)

Związek **12e** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 10. Po utworzeniu soli otrzymano 0.251 g (0.40 mmola) produktu **13e** z wydajnością 40%. TLC w układzie 9, *R*_f = 0.48.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.91 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz 2x(CH₃)); 1.32 (m, 8H, 4x(CH₂)); 1.63 (m, 4H, 2x(CH₂)); 2.14 (s, 3H, CH₃C(O)); 2.35 (t, 4H, *J* = 7.5 Hz 2x(CH₂C(O))); 2.89 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.31 (m, 2H, NCH₂C(O)); 3.80 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.15-4.32 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.72 (m, 1H, NHCH); 5.78 (dd, 2H, *J* = 5.5 Hz, OCH₂O); 6.86 (ABq, 2H, *J* = 15.5 Hz, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 13.21, 21.27, 22.98, 24.56, 30.23, 34.38, 42.36, 51.45, 52.31, 57.63, 58.78, 63.17, 77.61, 132.15, 135.42, 163.76, 165.91, 168.35, 170.27, 171.43, 171.87.

6.5.6 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu *N*²-(*bis-N,N*-(2-benzoiloksyetylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (13f)

Związek **12f** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 10. Po utworzeniu soli otrzymano 0.263 g (0.41 mmola) produktu **13f** z wydajnością 41%. TLC w układzie 9, *R*_f = 0.41.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 2.09 (s, 3H, CH₃C(O)); 3.18 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H, 2x(CH₂N)); 3.53 (s, 2H, NCH₂C(O)); 3.72 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.53 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.58 (m, 1H, NHCH); 5.83 (dd, 2H, *J* = 5.6 Hz, OCH₂O); 6.82 (ABq, 2H, *J* = 15.4 Hz, CH=CH); 7.35-7.90 (m, 10H, aromat.).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 21.33, 42.56, 50.59, 51.34, 51.87, 52.54, 64.34, 77.89, 128.67, 129.72, 130.54, 131.84, 133.78, 135.92, 163.87, 164.27, 165.69, 168.19, 169.46, 170.43.

6.5.7 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-(3-bromobenzoiloksy)etylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13g)

Związek **12g** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 10. Po utworzeniu soli otrzymano 0.279 g (0.35 mmola) produktu **13g** z wydajnością 35%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.43$.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 2.10 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 3.07 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.40 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.73 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.49 (m, 4H, $2x((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.66 (m, 1H, NHCH); 5.72 (dd, 2H, $J = 5.6$ Hz, OCH_2O); 6.83 (ABq, 2H, $J = 15.4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$); 7.23-8.07 (m, 8H, aromat.).

$^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 21.89, 42.16, 50.87, 51.12, 51.96, 52.12, 64.87, 78.34, 122.26, 129.38, 130.89, 131.34, 133.29, 135.57, 163.38, 164.67, 165.36, 168.75, 169.18, 170.58.

6.5.8 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-nikotynoiloksy)etylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13h)

Związek **12h** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 11. Po utworzeniu soli otrzymano 0.302 g (0.47 mmola) produktu **13h** z wydajnością 47%. TLC w układzie 11, $R_f = 0.39$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 2.12 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 3.14 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.46 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.73 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.54 (m, 4H, $2x((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.69 (m, 1H, NHCH); 5.83 (dd, 2H, $J = 5.5$ Hz, OCH_2O); 6.82 (ABq, 2H, $J = 15.5$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$); 7.38-9.19 (m, 8H, aromat.).

$^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 21.37, 42.56, 50.48, 51.32, 51.74, 52.43, 64.39, 78.21, 128.82, 129.51, 130.36, 131.39, 134.29, 148.57, 151.11, 163.38, 164.67, 165.36, 168.75, 169.18, 170.58.

6.5.9 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(N -(2-(acetoksy)etylo)- N -(2-(benzoiloksy)etylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13i)

Związek **12i** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.272 g (0.47 mmola) produktu **13i** z wydajnością 47%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.23$.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 1.98 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 2.10 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 2.85-3.08 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.36 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.75 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.10-4.53 (m, 4H,

2x((CH₂OC(O))); 4.67 (m, 1H, NHCH); 5.72 (dd, 2H, *J* = 5.6 Hz, OCH₂O); 6.82 (ABq, 2H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH); 7.40-8.08 (m, 5H, aromat.).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 20.58, 21.49, 42.23, 50,73, 51.59, 51.52, 52.82, 64.59, 77.51, 128.79, 129.54, 130.69, 131.47, 133.89, 135.59, 163.27, 164.36, 165.43, 168.59, 169.29, 170.71, 171.51.

6.5.10 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu *N*²-(*N*-(2-(acetoksy)etylo)-*N*-(2-((3-trifluorometylo)benzoiloksy)etylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13j)

Związek **12j** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.259 g (0.40 mmola) produktu **13j** z wydajnością 40%. TLC w układzie 9, *R_f* = 0.26.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 2.01 (s, 3H, CH₃C(O)); 2.11 (s, 3H, CH₃C(O)); 2.85-3.08 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.35 (s, 2H, NCH₂C(O)); 3.75 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.10-4.57 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.68 (m, 1H, NHCH); 5.72 (dd, 2H, *J* = 5,6 Hz, OCH₂O); 6.86 (ABq, 2H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH); 7.53-8.29 (m, 4H, aromat.).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 20.21, 21.87, 42.03, 50,31, 51.28, 51.85, 52.63, 64.66, 77.94, 126.82, 129.35, 129.79, 131.25, 133.09, 135.85, 163.12, 164.59, 165.31, 168.42, 169.79, 170.51, 171.20.

6.5.11 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu *N*²-(*N*-(2-(acetyloksy)etylo)-*N*-(2-(nikotynoiloksy)etylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13k)

Związek **12k** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą octan etylu. Po utworzeniu soli otrzymano 0.261 g (0.45 mmola) produktu **13k** z wydajnością 45%. TLC w układzie 11, *R_f* = 0.56.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.04 (s, 3H, CH₃C(O)); 2.13 (s, 3H, CH₃C(O)); 2.92-3.20 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.40 (m, 2H, NCH₂C(O)); 3.77 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.15-4.57 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.71 (m, 1H, NHCH); 5.75 (dd, 2H, *J* = 5.5 Hz, OCH₂O); 6.82 (ABq, 2H, *J* = 15.5 Hz, CH=CH); 7.31-9.23 (m, 4H, aromat.).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 20.55, 21.57, 42.21, 50,63, 51.55, 51.89, 52.71, 64.67, 78.08, 128.21, 129.34, 130.29, 131.58, 134.47, 148.38, 151.56, 163.61, 164.23, 165.59, 168.31, 169.79, 170.81.

6.5.12 Chlorowodorek estru acetoksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-(2,2-dimetylopropionyloksy)etylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13l)

Związek **12l** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 10. Po utworzeniu soli otrzymano 0.252 g (0.42 mmola) produktu **13l** z wydajnością 42%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.55$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.22 (s, 18H, $2 \times ((\text{CH}_3)_3)$); 2.14 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 2.91 (m, 4H, $2 \times (\text{CH}_2\text{N})$); 3.31 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.79 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.24 (m, 4H, $2 \times ((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.74 (m, 1H, NHCH); 5.79 (dd, 2H, $J = 5.5$ Hz, OCH_2O); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.5$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 21.32, 27.96, 42.56, 51.47, 52.51, 56.75, 57.91, 63.08, 77.84, 131.67, 134.42, 163.87, 165.37, 168.52, 169.95, 170.71, 171.82.

6.5.13 Chlorowodorek estru piwaloiloksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-acetoksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13m)

Związek **12m** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.257 g (0.46 mmola) produktu **13m** z wydajnością 52%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.57$.

^1H NMR (200MHz, CDCl_3): δ 1.20 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.09 (s, 6H, $2 \times (\text{CH}_3\text{C}(\text{O}))$); 2.86 (m, 4H, $2 \times (\text{CH}_2\text{N})$); 3.29 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.78 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.10-4.40 (m, 4H, $2 \times ((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.70 (m, 1H, NHCH); 5.75 (dd, 2H, $J = 5.4$ Hz, OCH_2O); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 21.04, 26.43, 38.82, 41.53, 47.89, 51.39, 56.47, 57.51, 63.43, 77.64, 131.69, 135.62, 165.67, 166.49, 166.51, 170.63, 170.93, 176.72.

6.5.14 Chlorowodorek estru 2-etylobutyryloksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(acetoksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13n)

Związek **12n** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.269 g (0.47 mmola) produktu **13n** z wydajnością 43%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.47$.

^1H NMR (200MHz, CDCl_3): δ 0.87 (t, 6H, $J = 7.4$ Hz, $2 \times (\text{CH}_3)$); 1.57 (m, 6H, $2 \times (\text{CH}_2)$); 2.09 (s, 6H, $2 \times (\text{CH}_3\text{C}(\text{O}))$); 2.27 (m, 1H, $\text{CHC}(\text{O})$); 2.89 (m, 4H, $2 \times (\text{CH}_2\text{N})$); 3.30 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.78 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.10-4.40 (m, 4H, $2 \times ((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.70 (m, 1H, NHCH); 5.80 (dd, 2H, $J = 5.5$ Hz, OCH_2O); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 12.82, 21.12, 24.69, 41.52, 48.42, 48.79, 51.37, 56.46, 57.89, 63.45, 81.61, 131.73, 135.49, 165.36, 166.63, 167.12, 170.28, 170.61, 173.57.

6.5.15 Chlorowoderek estru 2-metylopropionylksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(acetoksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13o)

Związek **12o** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.218 g (0.40 mmola) produktu **13o** z wydajnością 40%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.39$.

^1H NMR (200MHz, CDCl_3): δ 1.16 (d, 6H, $J = 6.5\text{Hz}$, $2x(\text{CH}_3)$); 2.09 (s, 6H, $2x(\text{CH}_3\text{C}(\text{O}))$); 2.69 (m, 1H, CH); 2.98 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.75 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.10-4.40 (m, 4H, $2x((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.69 (m, 1H, NHCH); 5.78 (dd, 2H, $J = 5.4\text{ Hz}$, OCH_2O); 6.89 (ABq, 2H, $J = 15.4\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 18.28, 21.67, 32.89, 41.44, 48.26, 51.38, 56.51, 57.83, 63.49, 81.45, 131.78, 135.37, 165.21, 166.74, 166.62, 170.41, 170.63, 175.87.

6.5.16 Chlorowoderek estru fenyloacetoksymetylowy N^2 -(bis- N,N -(acetoksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13p)

Związek **12p** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.219 g (0.37 mmola) produktu **13p** z wydajnością 37%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.53$.

^1H NMR (200MHz, CDCl_3): δ 2.09 (s, 6H, $2x(\text{CH}_3\text{C}(\text{O}))$); 3.05 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.71 (s, 2H, CH_2); 3.78 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.10-4.40 (m, 4H, $2x((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.65 (m, 1H, NHCH); 5.75 (dd, 2H, $J = 5.4\text{ Hz}$, OCH_2O); 6.88 (ABq, 2H, $J = 15.4\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 21.72, 40.41, 41.86, 48.55, 51.34, 56.72, 57.69, 63.64, 81.51, 127.94, 129.59, 130.88, 131.47, 135.49, 136.75, 165.63, 166.26, 166.83, 167.47, 170.91, 171.20.

6.5.17 Chlorowoderek estru 1-(acetoksy)etylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(acetoksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (13r)

Związek **12r** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.186 g (0.35 mmola) produktu **13r** z wydajnością 35%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.37$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.50 (m, 3H, CH_3); 2.09 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 2.11 (s, 6H, $2x(\text{CH}_3\text{C}(\text{O}))$); 2.88 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.31 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.78 (s, 5H, OCH_3 ,

HNCH₂); 4.10-4.35 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.67 (m, 1H, NHCH); 6.90 (m, 2H, OCHO); 6.90 (m, 2H, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 20.49, 21.56, 21.78, 41.50, 49.62, 51.89, 56.47, 57.83, 63.61, 93.76, 131.41, 135.97, 165.38, 166.49, 166.93, 169.80, 170.81, 171.48.

6.5.18 Chlorowoderek estru 1-(acetoksy)propylowy N²-(bis-N,N-(acetoksyetylo)glicylo)-N³-(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (13s)

Związek **12s** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.223 g (0.41 mmola) produktu **13s** z wydajnością 41%. TLC w układzie 9, R_f = 0.42.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.97 (m, 3H, CH₃); 1.82 (m, 2H, CH₂); 2.11 (s, 3H, CH₃C(O)); 2.13 (s, 6H, 2x(CH₃C(O))); 2.92 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.40 (m, 2H, NCH₂C(O)); 3.79 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.10-4.35 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.69 (m, 1H, NHCH); 6.70 (m, 2H, OCHO); 6.80 (m, 2H, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.54, 21.29, 21.84, 28.77, 41.89, 48.85, 51.79, 56.20, 57.89, 63.49, 96.74, 131.29, 135.96, 165.20, 165.73, 167.08, 169.46, 170.27, 170.92

6.5.19 Chlorowoderek estru 1-(etoksykarbonyloksy)etylowy kwasu N²-(bis-N,N-(acetoksyetylo)glicylo)-N³-(4-metoksyfumarolo)-L-2,3-diaminopropanowego (13t)

Związek **12t** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.213 g (0.38 mmola) produktu **13t** z wydajnością 38%. TLC w układzie 9, R_f = 0.44.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.32 (m, 3H, CH₃); 1.58 (m, 2H, CH₂); 2.09 (s, 6H, 2x(CH₃C(O))); 2.89 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.28 (m, 2H, NCH₂C(O)); 3.75 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.10-4.35 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.22 (m, 2H, CH₂); 4.71 (m, 1H, NHCH); 6.75 (m, 1H, OCHO); 6.90 (m, 2H, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 14.22, 19.34, 21.85, 41.21, 52.79, 54.56, 56.36, 57.87, 63.52, 65.67, 93.38, 130.47, 136.81, 154.50, 165.92, 166.59, 167.43, 170.53, 171.21.

6.5.20 Chlorowoderek estru piwaloiloksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-propionyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13u)

Związek **12u** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.271 g (0.45 mmola) produktu **13u** z wydajnością 45%. TLC w układzie 9, $R_f = 0,59$.

^1H NMR (200MHz, CDCl_3): δ 1.13 (t, 6H, $J = 7.6$ Hz, $2x(\text{CH}_3)$), 1.20 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.36 (q, 4H, $J = 7.6$ Hz, $2x(\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))$), 2.86 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2\text{N})$), 3.27 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$), 3.78 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2) 4.10-4.40 (m, 4H, $2x((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$), 4.70 (m, 1H, NHCH), 5.75 (dd, 2H, $J = 5.5$ Hz, OCH_2O), 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 9.68, 26.23, 27.83, 38.22, 41.39, 47.84, 51.42, 55.47, 57.63, 63.23, 81.82, 131.62, 135.58, 165.20, 166.56, 166.91, 170.35, 171.66, 176.88.

6.5.21 Chlorowoderek estru piwaloiloksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-benzoiloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13w)

Związek **12w** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.293 g (0.42 mmola) produktu **13w** z wydajnością 42%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.75$.

^1H NMR (200MHz, CDCl_3): δ 1.19 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3.20 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.55 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.70 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.40-4.70 (m, 5H, $2x((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$, NHCH); 5.75 (dd, 2H, $J = 5.6$ Hz, OCH_2O); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$); 7.30-7.70 (m, 8H, aromat.), 7.95 (m, 4H, aromat.).

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 26.21, 38.86, 41.51, 47.89, 51.77, 50.63, 51.08, 64.49, 81.37, 129.66, 130.59, 131.23, 131.51, 133.44, 135.63, 164.91, 165.48, 166.03, 166.55, 170.22, 176.12.

6.5.22 Chlorowoderek estru 2-etylobutyryloksymetylowy kwasu N^2 -(bis- N,N -(propionyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumarolilo)-L-2,3-diaminopropanowego (13v)

Związek **12v** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Po utworzeniu soli otrzymano 0.271 g (0.44 mmola) produktu **13v** z wydajnością 44%. TLC w układzie, 9 $R_f = 0,61$.

^1H NMR (200MHz, CDCl_3): δ 0.90 (m, 6H, $2x(\text{CH}_3)$); 1.14 (t, 6H, $J = 7,50$, $2x(\text{CH}_3)$); 1.60 (m, 6H, $2x(\text{CH}_2)$); 2.28 (m, 1H, $\text{CHC}(\text{O})$); 2.38 (q, 4H, $J = 7,50$, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$); 2.92 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.33 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.79 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.10-4.40 (m, 4H,

2x((CH₂OC(O))); 4.72 (m, 1H, NHCH); 5.80 (dd, 2H, $J = 5,5$ Hz, OCH₂O); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15,5$ Hz, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 9.67, 12.09, 24.58, 27.67, 41.14, 48.39, 48.21, 51.44, 55.98, 56.82, 63.89, 80.79, 131.26, 136.14, 165.52, 166.62, 167.23, 170.84, 171.14, 174.09.

6.7 Ogólny sposób syntezy trifluoroocentanów pochodnych kwasu *N*²-(*N,N*-(2-acyloksyetylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (16)

a) Synteza estru *tert*-butylowego kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego.

Do ochłodzonego na łaźni lodowej (0-5°C) roztworu zawierającego 10.10 g (31.96 mmola) *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowego (4), 2.36 g (31.96 mmola) alkoholu *tert*-butylowego, 3.90 g (31.96 mmola) DMAP w 40 ml chlorku metylenu dodano 6.91 g (33.55 mmola) DCC rozpuszczonego w 25 ml chlorku metylenu. Całość mieszano przez 24h. Po tym czasie osad DCU odsączono. Warstwę organiczną przemyto 0.25 M roztworem NaHSO₄, 1 M NaHCO₃ i dwukrotnie wodą, suszono bezwodnym MgSO₄, przesączono i odparowano. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 8. Otrzymano 6.54 g (17.58 mmola) związku 14 z wydajnością 55% t.t. 77-78°C, TLC w układzie 8, $R_f = 0.40$.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3.72 (m, 2H, NCH₂); 3.81 (s, 3H, OCH₃); 4.33 (m, 1H, CH); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.5$ Hz, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 27.33, 28.43, 43.15, 49.21, 51.78, 74.37, 80.58, 130.66, 131.83, 156.61, 163.71, 164.97, 171.94.

b) Synteza estru *tert*-butylowego kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (15).

Do 0.44 g (1.18 mmola) estru *tert*-butylowego kwasu *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowego (14) dodano 3 ml 30% roztworu TFA w chlorku metylenu. Reakcję kontrolowaną chromatograficznie w układzie 8 prowadzono przez 3h. Po zakończeniu reakcji dodano 10 ml chlorku metylenu. Warstwę organiczną przemyto 1 M NaHCO₃, dwukrotnie wodą, suszono bezwodnym MgSO₄, przesączono i odparowano. Otrzymano 0.27 g (1.00 mmola) związku 15 z wydajnością 85%. TLC w układzie 1, $R_f = 0.65$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3.74 (m, 2H, NCH_2); 3.79 (s, 3H, OCH_3); 4.36 (m, 1H, CH); 6.91 (ABq, 2H, $J = 15.5$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

c) Synteza estru *tert*-butylowego pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo))glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (**16**).

Do ochłodzonego na łaźni lodowej (0-5°C) roztworu 0.27 g (1.00 mmola) estru *tert*-butylowego kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (**15**), 1.01 g (1.00 mmola) trietyloaminy w 10 ml THF, dodano 1 mmol odpowiedniego estru *N*-hydroksysukcynoimidowego N,N -(2-acyloksyetylo)glicyny (**11**). Reakcję prowadzono przez 24h. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w octanie etylu, przemyto 1M NaHCO_3 i dwukrotnie wodą. Warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO_4 , przesączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt reakcji oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym.

d) Synteza trifluoroocetanów pochodnych kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo))glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (**16**).

Do estru *tert*-butylowego odpowiedniej pochodnej kwasu N^2 -(N,N -(2-acyloksyetylo))glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (**16**) dodano 3 ml bezwodnego TFA. Po 15h nadmiar kwasu odparowano, a pozostałość przemyto dwukrotnie bezwodnym eterem dietylowym. Wytrącony osad trifluoroocetanu odpowiedniej pochodnej **17** suszono w eksykatorze próżniowym.

6.7.1 Trifluoroocetan kwasu N^2 -(*bis*- N,N -(2-acetoksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowy (**17a**)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 7. Otrzymano 0.260 g (0.52 mmola) związku **16a** z wydajnością 52%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.22$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.10 (s, 6H, $2x(\text{CH}_3\text{C}(\text{O}))$); 2.12 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O}))$); 2.85 (m, 4H, $2x(\text{CH}_2\text{N})$); 3.27 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O}))$); 3.80 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.05-4.40 (m, 4H, $2x((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.58 (m, 1H, NHCH); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15,4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.263 g (0.47 mmola) związku **17a** z wydajnością 90%, t.t. = 99-101°C.

^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ 2.11 (s, 6H, $2\times(\text{CH}_3\text{C}(\text{O}))$); 3.68 (m, 4H, $2\times(\text{CH}_2\text{N})$); 3.80 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.23 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.45 (t, 4H, $J = 4.6$ Hz, $2\times((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.65 (m, 1H, NHCH); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 21.21, 42.77, 43.32, 51.76, 53.26, 55.80, 63.45, 131.45, 134.82, 165.01, 168.77, 169.73, 170.92, 171.74.

6.7.2 Trifluoroocetan kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-propionyloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksy-fumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (17b)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Otrzymano 0.259 g (0.49 mmola) związku **16b** z wydajnością 49%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.37$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.13 (t, 6H, $J = 7.6$ Hz, $2\times(\text{CH}_3)$); 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.38 (q, 4H, $J = 7.4$ Hz, $2\times(\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))$); 2.89 (m, 4H, $2\times(\text{CH}_2\text{N})$); 3.30 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.78 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.10-4.40 (m, 4H, $2\times((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.58 (m, 1H, NHCH); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.252 g (0.43 mmola) związku **17b** z wydajnością 88%, t.t. = 90-92 °C.

^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ 1.05 (t, 6H, $J = 7.6$ Hz, $2\times(\text{CH}_3)$); 2.38 (q, 4H, $J = 7.6$ Hz, $2\times(\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))$); 3.68 (t, 4H, $J = 4.6$ Hz, $2\times(\text{CH}_2\text{N})$); 3.80 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.23 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.45 (t, 4H, $J = 4.6$ Hz, $2\times((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.63 (m, 1H, NHCH); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.8$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 9.11, 25.34, 41.23, 42.83, 51.11, 51.39, 52.47, 63.66, 131.08, 133.41, 163.49, 165.28, 167.53, 170.67, 171.14.

6.7.3 Trifluoroocetan kwasu N^2 -(bis- N,N -(2-butyryloksyetylo)glicylo)- N^3 -(4-metoksy-fumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (17c)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Otrzymano 0.290 g (0.52 mmola) związku **16c** z wydajnością 52%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.47$.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 0.94 (t, 6H, $J = 7.5$ Hz, $2\times(\text{CH}_3)$); 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.64 (m, 4H, $2\times(\text{CH}_2)$); 2.32 (t, 4H, $J = 7.5$ Hz, $2\times(\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))$); 2.89 (m, 4H, $2\times(\text{CH}_2\text{N})$); 3.30 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.77 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.10-4.35 (m, 4H, $2\times((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.59 (m, 1H, NHCH); 6.88 (ABq, 2H, $J = 15.4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.289 g (0.47 mmola) związku **17c** z wydajnością 89%, t.t. = 86-87 °C.

¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ 0.87 (t, 6H, *J* = 7.4 Hz, 2x(CH₃)); 1.57 (m, 4H, 2x(CH₂)); 2.37 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz, 2x(CH₂C(O))); 3.68 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.77 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.23 (d, 2H, *J* = 4.0 Hz, NCH₂C(O)); 4.45 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.65 (m, 1H, NHCH); 6.90 (ABq, 2H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 13.22, 18.61, 35.66, 41.83, 42.75, 51.37, 51.68, 52.35, 63.68, 131.35, 132.89, 163.24, 165.68, 167.34, 171.33, 178.74.

6.7.4 Trifluorooctan kwasu *N*²-(*bis-N,N*-(2-pentanoiloksyetylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksy-fumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (**17d**)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 10. Otrzymano 0.269 g (0.46 mmola) związku **16d** z wydajnością 46%. TLC w układzie 9, R_f = 0.54.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.92 (t, 6H, *J* = 7.2 Hz, 2x(CH₃)); 1.32 (m, 4H, 2x(CH₂)); 1.44 (s, 9H, C((CH₃)₃)); 1.61 (m, 4H, 2x(CH₂)); 2.14 (s, 3H, CH₃C(O)); 2.35 (t, 4H, *J* = 7.2 Hz, 2x(CH₂C(O))); 2.89 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.30 (s, 2H, NCH₂C(O)); 3.77 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂) 4.10-4.35 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.59 (m, 1H, NHCH); 6.86 (ABq, 2H, *J* = 15.4 Hz, CH=CH).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.257 g (0.40 mmola) związku **17d** z wydajnością 87%, t.t. = 87-88 °C.

¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 0.88 (t, 6H, *J* = 7.2 Hz, 2x(CH₃)); 1.28 (m, 4H, 2x(CH₂)); 1.50 (m, 4H, 2x(CH₂)); 2.35 (t, 4H, *J* = 7.2 Hz, 2x(CH₂C(O))); 3.21 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.68 (d, 2H, *J* = 4.0 Hz, NCH₂C(O)); 3.72 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.22 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.55 (m, 1H, NHCH); 6.90 (ABq, 2H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 13.68, 22.61, 24.35, 35.86, 41.83, 43.72, 51.67, 51.96, 52.86, 62.68, 131.98, 133.21, 163.56, 165.23, 167.68, 171.77, 173.57.

6.7.5 Trifluorooctan kwasu *N*²-(*bis-N,N*-(2-heksanoiloksyetylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksy-fumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowego (**17e**)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 10. Otrzymano 0.276 g (0.45 mmola) związku **16e** z wydajnością 45%. TLC w układzie 9, R_f = 0.59.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.88 (t, 6H, *J* = 6.6 Hz, 2x(CH₃)); 1.23 (m, 8H, 4x(CH₂)); 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1.59 (m, 4H, 2x(CH₂)); 2.35 (t, 4 H, *J* = 7.6 Hz, 2x(CH₂C(O))); 2.98 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.39 (s, 2H, NCH₂C(O)); 3.77 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.13-4.32 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.56 (m, 1H, NHCH); 6.86 (ABq, 2H, *J* = 15.5Hz, CH=CH).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.262 g (0.39 mmola) związku **17e** z wydajnością 88%, t.t. = 93-94°C.

¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 0.88 (t, 6H, *J* = 6.6 Hz, 2x(CH₃)); 1.27 (m, 8H, 4x(CH₂)); 1.54 (m, 4H, 2x(CH₂)); 2.32 (t, 4 H, *J* = 7.6 Hz, 2x(CH₂C(O))); 3.22 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.69 (m, 2H, NCH₂C(O)); 3.74 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.24 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.46 (m, 1H, NHCH); 6.86 (ABq, 2H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH).

¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 13.32, 22.12, 23.33, 31.56, 34.45, 41.33, 42.98, 51.22, 51.46, 52.55, 62.23, 132.05, 133.74, 163.67, 165.68, 168.13, 171.44, 172.46.

6.7.6 Trifluorooctan kwasu *N*²-(*bis-N,N*-(2-benzoiloksyetylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (**17f**)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 10. Otrzymano 0.269 g (0.43 mmola) związku **16f** z wydajnością 43%. TLC w układzie 9, R_f = 0.54.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.36 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3.11 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.44 (m, 2H, NCH₂C(O)); 3.72 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.49 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.49 (m, 1H, NHCH); 6.82 (ABq, 2H, *J* = 15.4 Hz, CH=CH); 7.32-7.96 (m, 10H, aromat.).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.259 g (0.38 mmola) związku **17f** z wydajnością 89% w postaci amorficznego osadu.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 3.68 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.72 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.22 (m, 2H, NCH₂C(O)); 4.50 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.66 (m, 1H, NHCH); 6.77 (ABq, 2H, *J* = 15.5 Hz, CH=CH); 7.49-8.07 (m, 10H, aromat.).

¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 42.21, 43.76, 51.33, 52.43, 53.65, 62.65, 128.87, 130.13, 131.56, 131.79, 131.97, 134.44, 164.68, 165.33, 168.56, 169.11, 170.51.

6.7.7 Trifluorooctan kwasu *N*²-(*bis-N,N*-(2-(3-bromobenzoiloksy)etylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowego (**17g**)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 10. Otrzymano 0.297 g (0,38 mmola) związku **16g** z wydajnością 38%. TLC w układzie 9, R_f = 0.55.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3.10 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.40 (s, 2H, NCH₂C(O)); 3.74 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.47 (m, 1H, NHCH); 4.49 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 6.83 (ABq, 2H, *J* = 15.5 Hz, CH=CH); 7.23-8.12 (m, 8H, aromat.).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.286 g (0.34 mmola) związku **17g** z wydajnością 90%, t.t. = 58-59°C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 3.68 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 3.80 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 4.20 (m, 2H, NCH₂C(O)); 4.49 (m, 1H, NHCH); 4.65 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 6.83 (ABq, 2H, *J* = 15.5 Hz, CH=CH); 7.40-8.11 (m, 8H, aromat.).

¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 41.45, 43.33, 51.85, 52.86, 53.25, 62.68, 122.34, 127.23, 130.54, 131.29, 131.78, 132.44, 134.54, 164.12, 165.06, 168.35, 169.76, 171.24.

6.7.8 Trifluorooctan kwasu *N*²-(*bis-N,N*-(2-*nikotynoiloksyetylo*)glicylo)-*N*³-(4-*metoksyfumaroi*lo)-*L*-2,3-*diaminopropanowego* (**17h**)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 11. Otrzymano 0.251 g (0.40 mmola) związku **16h** z wydajnością 40%. TLC w układzie 11, *R*_f = 0.30.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.36 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3.18 (t, 4H, *J* = 5.4 Hz, 2x(CH₂N)); 3.50 (s, 2H, NCH₂C(O)); 3.72 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.53 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.53 (m, 1H, NHCH); 6.82 (ABq, 2H, *J* = 15.4 Hz, CH=CH); 7.38-9.19 (m, 8H, aromat.).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.347 g (0.38 mmola) związku **17h** z wydajnością 95%, t.t. = 54-56°C.

¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ 3.18 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.68 (m, 2H, NCH₂C(O)); 4.49 (m, 1H, NHCH); 4.75 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.75 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 6.82 (ABq, 2H, *J* = 15,6 Hz, CH=CH); 7.83-9.16 (m, 8H, aromat.).

¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 41.86, 42.35, 51.24, 53.15, 53.35, 62.29, 122.11, 124.84, 130.34, 133.09, 134.23, 148.75, 148.34, 151.27, 160.45, 165.64, 168.25, 169.96, 170.67.

6.7.9 Trifluorooctan kwasu *N*²-(*N*-(2-(*acetoksyetylo*)-*N*-(2-(*benzoiloksyetylo*)glicylo)-*N*³-(4-*metoksyfumaroi*lo)-*L*-2,3-*diaminopropanowego* (**17i**)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Otrzymano 0.253 g (0.45 mmola) związku **16i** z wydajnością 45%. TLC w układzie 9, *R*_f = 0.35.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1.99 (s, 3H, CH₃C(O)); 3.02 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.36 (s, 2H, NCH₂C(O)); 3.74 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.13 (m, 1H, NHCH);

4.17-4.58 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 6.89 (ABq, 2H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH); 7.38-8.06 (m, 5H, aromat.).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.248 g (0.40 mmola) związku **17i** z wydajnością 88%, t.t. = 53-55°C.

¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 2.02 (s, 3H, CH₃C(O)); 3.63 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.74 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.14 (s, 2H, NCH₂C(O)); 4.32-4.67 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 4.58 (m, 1H, NHCH); 6.89 (ABq, 2H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH); 7.49-8.04 (m, 5H, aromat.).

¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 21.32, 41.88, 43.34, 51.76, 52.55, 53.68, 62.79, 128.34, 130.67, 131.78, 131.89, 132.02, 134.65, 164.23, 164.78, 165.94, 168.27, 169.85, 170.95.

6.7.10 Trifluorooctan kwasu *N*²-(*N*-(2-(acetoksy)etylo)-*N*-((2-(3-trifluorometylo)benzoyloksy)etylo)glicylo)-*N*³-(4-metoksyfumaroilo)-*L*-2,3-diaminopropanowego (17j)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 9. Otrzymano 0.246 g (0.39 mmola) związku **16j** z wydajnością 39%. TLC w układzie 9, *R*_f = 0.37.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.38 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2.02 (s, 3H, CH₃C(O)); 2.90-3.08 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.35 (s, 2H, NCH₂C(O)); 3.75 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 4.17 (m, 1H, NHCH); 4.30-4.57 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 6.86 (ABq, 2H, *J* = 15.4 Hz, CH=CH); 7.59-8.30 (m, 4H, aromat.).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.248 g (0.36 mmola) związku **17j** z wydajnością 93% w postaci amorficznego osadu.

¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 2.01 (s, 3H, CH₃C(O)); 3.60-3.80 (m, 4H, 2x(CH₂N)); 3.75 (s, 5H, OCH₃, HNCH₂); 3.68 (s, 2H, NCH₂C(O)); 4.15 (m, 1H, NHCH); 4.33-4.68 (m, 4H, 2x((CH₂OC(O))); 6.77 (ABq, 2H, *J* = 15.5 Hz, CH=CH); 7.75-8.96 (m, 4H, aromat.).

¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 20.93, 41.24, 43.82, 51.73, 52.68, 53.28, 62.73, 122.21, 128.63, 130.82, 131.15, 131.59, 132.85, 134.98, 165.23, 165.58, 165.95, 168.62, 169.63, 170.78.

6.7.11 Trifluoroocetan kwasu N^2 -(N -(2-(acetyloksy)etylo)- N -(2-(nikotynoiloksy)etylo)-glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroi)- L -2,3-diaminopropanowego (17k)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą octan etylu. Otrzymano 0.237 g (0.42 mmola) związku **16k** z wydajnością 42%. TLC w układzie 11, $R_f = 0.47$

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 1.40 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.04 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 2.95-3.17 (m, 4H, $2\times(\text{CH}_2\text{N})$); 3.44 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.75 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.18 (m, 1H, NHCH); 4.49-4.56 (m, 4H, $2\times((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 6.82 (ABq, 2H, $J = 15.5$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$); 7.35-9.25 (m, 4H, aromat.).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.250 g (0.34 mmola) związku **17k** z wydajnością 90%, t.t. = 55-56°C.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, D_2O): δ 2.00 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 3.62 (m, 4H, $2\times(\text{CH}_2\text{N})$); 3.77 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.15 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.40 (m, 4H, $2\times((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.52 (m, 1H, NHCH); 6.82 (ABq, 2H, $J = 15.5$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$); 7.95-9.26 (m, 4H, aromat.).

$^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, CD_3OD): δ 20.81, 41.21, 42.95, 51.74, 53.27, 53.93, 62.83, 122.69, 125.24, 130.48, 133.50, 134.28, 148.98, 149.02, 151.84, 161.438, 164.63, 165.21, 168.59, 170.07, 170.59.

6.7.12 Ester *tert*-butylowy kwasu N^2 -(*bis*- N,N -(2-(2,2-dimetylopropanoiloksy)etylo)-glicylo)- N^3 -(4-metoksyfumaroi)- L -2,3-diaminopropanowego (17l)

Związek oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie 10. Otrzymano 0.257 g (0.44 mmola) związku **16l** z wydajnością 44%. TLC w układzie 9, $R_f = 0.68$.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 1.21 (s, 18H, $2\times(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$); 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.90 (m, 4H, $2\times(\text{CH}_2\text{N})$); 3.31 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 3.77 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.23 (m, 4H, $2\times((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.59 (m, 1H, NHCH); 6.90 (ABq, 2H, $J = 15.4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

Po usunięciu estru *tert*-butylowego otrzymano 0.238 g (0.37 mmola) związku **17l** z wydajnością 85%, t.t. = 142-143°C.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO): δ 1.21 (s, 18H, $2\times(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$); 3.52 (m, 4H, $2\times(\text{CH}_2\text{N})$); 3.72 (s, 5H, OCH_3 , HNCH_2); 4.01 (d, 2H, $J = 4,8$ Hz, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); 4.33 (m, 4H, $2\times((\text{CH}_2\text{OC}(\text{O}))$); 4.47 (m, 1H, NHCH); 6.79 (ABq, 2H, $J = 15.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, CD_3OD): δ 27.36, 40.82, 42.21, 43.58, 52.12, 53.59, 56.09, 63.31, 131.39, 134.35, 165.59, 168.59, 169.84, 171.03, 171.73.

6.8 Wyznaczanie powinowactwa związków do błony biologicznej ($\log k'_{IAM}$)

Oddziaływanie związków z unieruchomioną sztuczną błoną biologiczną badano przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej faz odwróconych (RF-HPLC) na kolumnie IAM.PC.DD 2 (Regis Technologies, Inc., Morton Grove, IL, USA) o wymiarach 3.5 cm x 4.6 mm, której wypełnienie symuluje pojedynczą warstwę błony biologicznej. Ziarna wypełnienia miały średnicę 12 μm , a średnica porów wynosiła 30 nm. Układ chromatograficzny składał się z pompy model G1311A, detektora UV/VIS model G1315B integratora model G2070 (Agilent Technologies 1200 Series). Fazę ruchomą stanowił układ zawierający bufor Sörensen (0.1M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) i acetonitryl zmieszanych w stosunku 50:50, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 90:10 (v:v). Detekcja analizowanych związków miała miejsce przy długości fali 254 nm. Objętość nastrzyku wynosiła 20 μl . Do wyznaczania czasu martwego kolumny (t_0) użyto kwasu cytrynowego, którego detekcję przeprowadzono przy długości fali 220 nm. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min. Związki charakteryzowano przez wyznaczenie logarytmów współczynników $\log k'_{IAM}$.

$$\log k'_{IAM} = \log \left(\frac{t_R - t_0}{t_0} \right)$$

gdzie:

t_0 - martwy czas retencji, wyznaczony dla kwasu cytrynowego

t_R - czas retencji związku

Podstawą ekstrapolacji wyznaczonych parametrów retencji do wartości dla czystego buforu była liniowa zależność pomiędzy $\log k'_{IAM}$, a ułamkiem rozpuszczalnika w fazie ruchomej.

$$\log k'_{IAM} = \log k_0 + bC$$

gdzie:

b - stała liczbowa

C - stężenie rozpuszczalnika organicznego (acetonitrylu) w fazie ruchomej (% v/v)

6.9 Wyznaczenie trwałości otrzymanych pochodnych

1 mg związku rozpuszczono w 1 ml wody lub ekstraktu bezkomórkowego, a następnie związki inkubowano w temperaturze 30°C. Przebieg reakcji kontrolowano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej faz odwróconych (RF-HPLC) na kolumnie Zorbax SB-C18 o wymiarach 15 cm x 4.6 mm pobierając próbki co 30 min. Detekcja analizowanych związków miała miejsce przy długości fali 254 nm. Objętość nastrzyku wynosiła 0,5 µl.

7. WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

1. **Koszel D.**, Andruszkiewicz R., Estryfikacja grup hydroksylowych *N,N*-bis-(2-hydroksyetylo)glicyny. *XLIX Zjazd PTChem i SITPChem, 17-22.09.06, Gdańsk, Poland.*
2. Andruszkiewicz R., **Koszel D.**, A simple access to *O*-acyl bicine. *Polish J. Chem.*, 81, 295-298, 2007.
3. **Koszel D.**, Andruszkiewicz R., Synthesis and biological activity of lipophilic derivatives of glucosamine-6-phosphate synthase inhibitors. *19th Polish Peptide Symposium, 23-27.09.2007, Pułtusk, Poland.*
4. **Koszel D.**, Andruszkiewicz R., Lipophilic derivatives of glucosamine-6-phosphate synthase inhibitors. *I Konwersatorium Chemii Medycznej, 19-20.09.2008, Lublin, Poland.*
5. **Koszel D.**, Andruszkiewicz R., Synthesis of latent and lipophilic derivatives of GlcN-6-P synthase inhibitors. *Joint Meeting on Medicinal Chemistry, 24-27.06.2009, Budapest, Hungary.*
6. **Koszel D.**, Andruszkiewicz R., Synthesis and lipophilicity determination of bicine derivatives of GlcN-6-P synthase inhibitors. *II Konwersatorium Chemii Medycznej, 8-10.09.2009, Lublin, Poland.*

8. LITERATURA

1. Meunier F., Targeting fungi: a challenge. *Am. J. Med.*, 99 (Suppl 6A), 605-675, **1995**.
2. Sternberg S., The emerging fungal threat. *Science*, 266, 1632-1634, **1994**.
3. Saral R., Candida and Aspergillus infections in immunocompromised patients: an overview. *Rev. Infect. Dis.*, 13, 487-492, **1991**.
4. Ablordeppey S.Y., Fan P., Ablordeppey J.H., Mardenborough L., Systemic antifungal agents against AIDS-related opportunistic infections: Current status and emerging drugs in development. *Curr. Med. Chem.*, 6, 1151-1195, **1999**.
5. Georgopapadakou N.H., Walsh T.J., Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 279-291, **1996**.
6. Groll A.H., Walsh T.J., Antifungal chemotherapy: Advances and perspectives. *Swiss Med. Wkly.*, 132, 303-311, **2002**.
7. Kidwai M., Venkataramanan R., Rostogi S., Sapra P., Discovery and development of antifungal compounds. *Curr. Med. Chem. - Anti-Infective Agents.*, 2, 27-71, **2003**.
8. Kontoyiannis D.P., Lewis R.E., Combination chemotherapy for invasive fungal infections: what laboratory and clinical studies tell us so far. *Drug Resistance Updates*, 6, 257-269, **2003**.
9. Klastersky J., Empirical antifungal therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 23, 105-112, **2004**.
10. Sundriyal S., Sharma R.K., Jain R., Current advances in antifungal targets and drug development. *Curr. Med. Chem.*, 13, 1321-1335, **2006**.
11. Borowski E., Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *Il Farmaco*, 55, 206-208, **2000**.
12. Chmara H., Borowski E., Antibiotic tetracycline, a new inhibitor of murein precursor synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, 1381-1387, **1973**.
13. Milewski S., Glucosamine-6-phosphate synthase - the multi-facets enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 1597, 173-192, **2002**.
14. Chmara H., Smulkowski M., Borowski E., Growth inhibitory effect of amidotransferase inhibition in *Candida albicans* by epoxy-peptides. *Drugs Under Exptl. Clin. Res.*, 6, 7-14, **1980**.

15. Milewski S., Chmara H., Borowski E., Antibiotic tetaine - a selective inhibitor of chitin and mannoprotein biosynthesis in *Candida albicans*. *Acta Microbiol.*, 145, 234-240, **1986**.
16. Bates C.J., Adams W.R., Handschumacher R.E., Control of the formation of uridine diphosphate *N*-acetyl-hexosamine and glycoprotein synthesis in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 241, 1705-1712, **1966**.
17. Bontemps-Gracz M., Milewski S., Borowski E., The influence of L-norvalyl-*N*³-4-methoxyfumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic acid, an antifungal agent on mammalian cells in tissue culture. *Acta Biochim. Polon.*, 38, 229-239, **1991**.
18. Ghosh S., Blumenthal H.J., Davidson E., Roseman S., Glucosamine metabolism. V. Enzymatic synthesis of glucosamine 6-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 235, 1265-1273, **1960**.
19. Pogell B.M., Gryder R.M., Enzymatic synthesis of glucosamine-6-phosphate in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 228, 701-712, **1957**.
20. Mei B., Zalkin H., A cysteine-histidine-aspartate catalytic triad is involved in glutamine amide transfer function in purF-type glutamine amidotransferases. *J. Biol. Chem.*, 264, 16613-16619, **1989**.
21. Weng M., Zalkin H., Structural role for a conserved region in the CTP synthetase glutamine amide transfer domain. *J. Bacteriol.*, 169, 3023-3028, **1987**.
22. Milewski S., Kuszczak D., Jędrzejczak R., Smith R.J., Brown A.J.P., Gooday G.W., Oligomeric structure and regulation of *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.*, 274, 4000-4008, **1999**.
23. Kornfeld R., Studies on L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-*N*-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.*, 242, 3135-3141, **1967**.
24. Gabriel I., Olchowy J., Stanisławska-Sachadyn A., Mio T., Kur J., Milewski S., Phosphorylation of glucosamine-6-phosphate synthase is important but not essential for germination and mycelial growth of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 235, 73-80, **2004**.
25. Isupov M.N., Obmolova G., Butterworth S., Badet-Denisot M.A., Badet B., Polikarpov I., Littlechild J.A., Teplyakov A., Substrate binding is required for assembly of the active conformation of the catalytic site in Ntn amidotransferases: evidence for the 1.8 Å crystal structure of the glutaminase domain of glucosamine-6-phosphate synthase. *Structure*, 4, 801-810, **1996**.

26. Teplyakov A., Obmolova G., Badet-Denisot M.A., Badet B., Polikarpov I., Involvement of the C terminus in intramolecular nitrogen channeling in glucosamine-6-phosphate synthase: evidence from a 1.6 Å crystal structure of the isomerase domain. *Structure*, 6, 1047-1055, **1998**.
27. Teplyakov A., Obmolova G., Badet B., Badet-Denisot M.A., Channeling of ammonia in glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Mol. Biol.*, 313, 1093-1102, **2001**.
28. Floquet N., Durand P., Maigret B., Badet B., Badet-Denisot M.A., Perahia D.J., Collective motions in glucosamine-6-phosphate synthase: influence of ligand binding and role in ammonia channelling and opening of the fructose-6-phosphate binding site. *J. Mol. Biol.*, 385, 653-664, **2009**.
29. Mouilleron S., Badet-Denisot M.A., Golinelli-Pimpaneau B., Ordering of C-terminal loop and glutaminase domains of glucosamine-6-phosphate synthase promotes sugar ring opening and formation of the ammonia channel. *J. Mol. Biol.*, 377, 1174-1185, **2008**.
30. Durand P., Golinelli-Pimpaneau B., Mouilleron S., Badet B., Badet-Denisot M.A., Highlights of glucosamine-6P synthase catalysis. *Arch., Biochem., Biophys.*, 474, 302-317, **2008**.
31. Teplyakov A., Leriche C., Obmolova G., Badet B., Badet-Denisot M.A., From Lobry de Bruyn to enzyme-catalyzed ammonia channelling: molecular studies of D-glucosamine-6P synthase. *Nat. Prod. Rep.*, 19, 60-69, **2001**.
32. Badet B., Vermoote P., Le Goffic F., Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by N^3 -fumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic derivatives. *Biochemistry*, 27, 2282-2287, **1988**.
33. Golinelli-Pimpaneau B., Badet B., Possible involvement of Lys603 from *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase in the binding of its substrate fructose-6-phosphate. *Eur. J. Biochem.*, 201, 175-182, **1991**.
34. Teplyakov A., Obmolova G., Badet-Denisot M.A., Badet B., The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine-6-phosphate synthase. *Protein Sci.*, 8, 596-602, **1999**.
35. Leriche C., Badet-Denisot M.A., Badet B., Affinity labeling of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase with a fructose 6-phosphate analog. *Eur. J. Biochem.*, 245, 418-422, **1997**.

36. Milewski S., Hoffmann M., Andruszkiewicz R., Borowski E., Investigation of mechanism of nitrogen transfer in glucosamine 6-phosphate synthase with the use of transition state analogs. *Bioorg. Chem.*, 25, 283-296, **1997**.
37. Bearne S. L., Wolfenden R., Glutamate γ -semialdehyde as a natural transition state analogue inhibitor of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase. *Biochemistry*, 34, 11515-11520, **1995**.
38. Bearne S.L., Active site-directed inactivation of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.*, 271, 3052-3057, **1996**.
39. Badet-Denisot M.A., Leriche C., Massiere F., Badet B., Nitrogen transfer in *E.coli* glucosamine-6P synthase. Investigations using substrate and bisubstrate analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 815-820, **1995**.
40. Mouilleron S., Badet-Denisot M.A., Golinelli-Pimpaneau B., Glutamine binding opens the ammonia channel and activates glucosamine-6P synthase. *J. Biol. Chem.*, 281, 4404-4412, **2006**.
41. Floquet N., Mouilleron S., Daher R., Maigret B., Badet B., Badet-Denisot M.A., Ammonia channeling in bacterial glucosamine-6-phosphate synthase (Glms): Molecular dynamics simulations and kinetic studies of protein mutants. *FEBS Letters*, 581, 2981-2987, **2007**.
42. Golinelli-Pimpaneau B., Le Goffic F., Badet B., Glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli*: Mechanism of the reaction at the fructose 6-phosphate binding site. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 3029-3034, **1989**.
43. Raczynska J., Olchowcy J., Konariev P.V., Svergun D.I., Milewski S., Rypniewski W., The crystal and solution studies of glucosamine-6-phosphate synthase from *Candida albicans*. *J. Mol. Biol.*, 372, 672-688, **2007**.
44. Richez C., Boetzel J., Floquet N., Koteswar K., Stevens, J., Badet B., Badet-Denisot M.A., Expression and purification of active human internal His₆-tagged L-glutamine: D-fructose-6P amidotransferase I. *Protein Expr. Purif.*, 54, 45-53, **2007**.
45. Zalkin H., The amidotransferases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 66, 203-309, **1993**.
46. Walker B., Brown M.F., Lynas J.F., Martin S.L., McDowell A., Badet B., Hill A.J., Inhibition of *Escherichia coli* glucosamine synthetase by novel electrophilic analogues of glutamine-comparison with 6-diazo-5-oxo-norleucine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 2795-2798, **2000**.

47. Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E., Inactivation of glucosamine-6-phosphate synthetase from *Salmonella typhimurium* LT2 by fumaroyl diaminopropanoic acid derivatives a novel group of glutamine analogs. *Biochim. Biophys. Acta*, 870, 357-366, **1985**.
48. Borowski E., Isolation of the pure tetaine from strain of *Bacillus pumilus*. *Bull. State Inst. Marine Trop. Med., Gdańsk*, 4, 310-318, **1952**.
49. Chmara H., Borowski E., Antibiotic tetaine, a new inhibitor of murein precursors synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, 1381-1387, **1973**.
50. Woynarowska B., Witkowski A., Borowski E., Differential inhibition of DNA and RNA biosynthesis in HeLa S3 cells by tetaine, a dipeptide antibiotic. *Biochim. Biophys. Acta*, 825, 199-206, **1985**.
51. Shah R., Neuss N., Gorman M., Boeck L.D., Isolation, purification and characterisation of anticapsin. *J. Antibiot.*, 23, 613-617, **1970**.
52. Andruszkiewicz R., Chmara H., Borowski E., Anticandidal activity of antibiotic A 19009 and its isomer. *J. Antibiot.*, 37, 1479-1482, **1984**.
53. Molloy B.B., Lively D.H., Gale R.M., Gorman M., Boeck L.D., A new dipeptide antibiotic from *Streptomyces collinus*, Lindenbein. *J. Antibiot.*, 25, 137-140, **1972**.
54. Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E., Inactivation of glucosamine-6-phosphate synthetase from *Salmonella typhimurium* LT 2 SL 1027 by *N* beta-fumarylcarboxyamido-L-2,3-diaminopropionic acid. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 120, 865-872, **1984**.
55. Milewski S., Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E., Synthetic derivatives of *N*³-fumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic acid inactivate glucosamine synthetase from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 828, 247-254, **1985**.
56. Andruszkiewicz R., Chmara H., Milewski S., Borowski E., Synthesis of *N*³-fumaramoyl-L-2,3-diaminopropanoic acid analogues, the irreversible inhibitors of glucosamine synthetase. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 27, 449-453, **1986**.
57. Andruszkiewicz R., Chmara H., Milewski S., Kasprzak L., Borowski E., Structural determinants of inhibitory activity of *N*³-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid towards glucosamine-6-phosphate synthase. *Pol. J. Chem.*, 67, 673-683, **1993**.
58. Milewski S., Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E., *N*³-haloacetyl derivatives of L-2,3-diaminopropanoic acid: novel inactivators of glucosamine-6-phosphate synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1115, 225-229, **1992**.

59. Andruszkiewicz R., Chmara H., Zieniawa T., Borowski E., Synthesis and biological activities of peptides containing N^3 -(S)-2-bromosuccinamoyl-(S)-2,3-diaminopropanoic acid. *Eur. J. Med. Chem.*, 29, 61-67, **1994**.
60. Andruszkiewicz R., Zieniawa T., Chmara H., Kasprzak L., Borowski E., Synthesis and anticandidal activities of optimized analogs of antibiotic Sch 37137. *J. Antibiot.*, 47, 715-723, **1994**.
61. Andruszkiewicz R., Synthesis and antifungal properties of diastereomers and analogs of antibiotic Sch 37137. *J. Antibiot.*, 47, 380-385, **1994**.
62. Andruszkiewicz R., Milewski S., Borowski E., Amide and ester derivatives of N^3 -trans-epoxysuccinoyl-L-2,3-diaminopropanoic acid: inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Enzyme Inhib.*, 9, 123-133, **1995**.
63. Wojciechowski M., Milewski S., Mazerski J., Borowski E., Glucosamine-6-phosphate synthase, a novel target for antifungal agents. Molecular modelling studies in drug design. *Acta Biochim. Polon.*, 52, 647-653, **2005**.
64. Kucharczyk N., Denisot M.A., Le Goffic F., Badet B., Glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli*: determination of the mechanism of inactivation by N^3 -fumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic derivatives. *Biochemistry*, 29, 3668-3676, **1990**.
65. Tarnowska M., Oldziej S., Liwo A., Grzonka Z., Borowski E., Investigation of the inhibition pathway of glucosamine synthase by N^3 -(4-mthoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid semiempirical quantum mechanical and molecular mechanics methods., *Eur. J. Biophys.*, 21, 273-280, **1992**.
66. Massiere F., Badet-Denisot M.A., Rene L., Badet B., Design, synthesis and evaluation of the first mechanism-based inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Am Chem. Soc.*, 119, 5748-5749, **2000**.
67. Janiak A.M., Hoffmann M., Milewska M.J., Milewski S., Hydrophobic derivatives of 2-amino-2-deoxy-D-glucitol-6-phosphate. A new type of D-glucosamine-6-phosphate synthase inhibitors with antifungal action. *Bioorg. Med. Chem.*, 11, 1653-1662, **2003**.
68. Milewski S., Janiak A., Wojciechowski M., Structural analogues of reactive intermediates as inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase and phosphoglucose isomerase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 450, 39-49, **2006**.
69. Le Camus L., Bedet-Denisot M.A., Badet B., Arabinose-5-phosphate oxime vs its methylenephosphonate mimetic as high energy intermediate of the glucosamine-6P synthase catalyzed reaction. *Tetrahedron Lett.*, 39, 2571-2572, **1998**.

70. Bearne S.L., Blouin C., Inhibition of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase by reactive intermediate analogues. *J Biol. Chem.*, 275, 135-140, **2000**.
71. Le Camus L., Bedet-Denisot M.A., Badet B., Stereoselective synthesis of 5-methylphosphono-D-arabino hydroximolactone, inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthase and phosphoglucose isomerase. *Tetrahedron Lett.*, 39, 287-288, **1998**.
72. Floquet N., Richez C., Durand P., Maigret B., Badet B., Badet-Denisot M.A., Discovering new inhibitors of bacterial glucosamine-6P synthase (GlmS) by docking simulations. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 1966-1970, **2007**.
73. Payne J.W., Drug delivery systems: optimising the structure of peptide carriers for synthetic antimicrobial drugs. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 12, 585-595, **1986**.
74. Andruszkiewicz R., Chmara H., Milewski S., Borowski E., Synthesis and biological properties of N^3 -(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid dipeptides, a novel group of antimicrobial agents. *J. Med. Chem.*, 30, 1715-1719, **1987**.
75. Andruszkiewicz R., Milewski S., Zieniawa T., Borowski E., Anticandidal properties of N^3 -(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid oligopeptides. *J. Med. Chem.*, 33, 132-135, **1990**.
76. Milewski S., Andruszkiewicz R., Kasprzak L., Mazerski J., Mignini F., Borowski E., Mechanism of action of anticandidal dipeptides containing inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35, 36-43, **1991**.
77. Chmara H., Milewski S., Andruszkiewicz R., Mignini F., Borowski E., Antibacterial action of dipeptides containing an inhibitor of glucosamine-6-phosphate isomerase. *Microbiology*, 144, 1349-1358, **1998**.
78. Milewski S., Andruszkiewicz R., Borowski E., Substrate specificity of peptide permeases in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 50, 73-78, **1988**.
79. Kasprzak L., Milewski S., Gumieniak J., Borowski E., The influence of serum proteins on biological activity of anticandidal peptides containing N^3 -(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid. *J. Chemother.*, 4, 88-93, **1992**.
80. Nowak-Jary J., Andruszkiewicz R., Payne J.W., Enzymatic degradation and transport of endotheiopeptides into *Escherichia coli* K12 mutant strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 285, 291-297, **2008**.
81. Nowak-Jary J., Antifungal activity of thionated analogues of Nva-FMDP and Lys-Nva-FMDP. *Pol. J. Microbiol.*, 58, 295-299, **2009**.

82. Andruszkiewicz R., Zieniawa T., Walkowiak A., Anticandidal properties of *N*-acylpeptides containing an inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 20, 115-121, **2005**.
83. Zgódka D., Jędrzejczak R., Milewski S., Borowski E., Amide and ester derivatives of *N*³-(4-methoxyfumaroyl)-(S)-2,3-diaminopropanoic acid - the selective inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthase. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 931-938, **2001**.
84. Walkowiak A., Wakieć R., Bontemps-Gracz M.M., Andruszkiewicz R., Glutamine analogues containing a keto function – novel inhibitors of fungal glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 20, 439-447, **2005**.
85. Janiak A., Cybulska B., Szlinder-Richert J., Borowski E., Milewski S., Facilitated diffusion of glucosamine-6-phosphate synthase inhibitors enhances their antifungal activity. *Acta Biochim. Polon.*, 49, 77-86, **2002**.
86. Clayton J.P., Cole M., Elson S.W., Ferres H., Hanson J.C., Mizen L.W., Sutherland R., Preparation, hydrolysis and oral absorption of esters of penicillins. *J. Med. Chem.*, 19, 1385-1391, **1976**.
87. Daehne W.V., Frederiksen E., Gundersen E., Lund F., Morch P., Petersen H.J., Roholt K., Tybring L., Godtfredsen W.O., Acyloxymethyl esters of ampicilin. *J. Med. Chem.*, 13, 607-612, **1970**.
88. Zgódka D., Milewski S., Borowski E., A diffusible analogue of *N*³-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid with antifungal activity. *Microbiology*, 147, 1955-1959, **2001**.
89. Greenwald R.B., Zhao H., Yang K., Reddy P., Martinez A., A new aliphatic amino prodrug system for the delivery of small molecules and proteins utilizing novel PEG derivatives. *J. Med. Chem.*, 47, 726-734, **2004**.
90. Suggs J.W., Pires R.M., Facile hydrolysis and formation of amide bonds by *N*-hydroxyethylation of α -amino acids. *Tetrahedron Lett.*, 38, 2227-2230, **1997**.
91. Ulich L.H., Adams R., The reaction between acid halides and aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.*, 43, 660-667, **1921**.
92. Andruszkiewicz R., Chmara H., Milewski S., Borowski E., Synthesis of *N*³-fumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic acid analogues, the irreversible inhibitors of glucosamine synthetase. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 27, 449-453, **1986**.
93. Tarbell D.S., Yamamoto Y., Pope B.M., New method to prepare *N*-*t*-butoxycarbonyl derivatives and the corresponding sulfur analogs from di-*t*-butyl dicarbonate or

- di-*t*-butyl dithiol dicarbonates and amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 730-732, **1972**.
94. Zhang L., Kauffman G.S., Pesti J.A., Yin J., Rearrangement of N_α-protected L-asparagines with iodosobenzene diacetate. A practical route to β-amino-L-alanine derivatives. *J. Org. Chem.*, 62, 6918-6920, **1997**.
 95. Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan, F.M., The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 1839-1842, **1964**.
 96. Daehne W.V., Frederiksen E., Gundersen E., Lund F., Morch P., Petersen H.J., Roholt K., Tybring L., Godtfredsen W.O., Acyloxymethyl esters of ampicillin. *J. Med. Chem.*, 13, 607-613, **1970**.
 97. Ono N., Yamada T., Saito T., Tanaka K., Kaji, A., A convenient procedure for esterification of carboxylic acids. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 51, 2401-2404, **1978**.
 99. Zgódka D., Cybulska B., Milewski S., Borowski E., Acyloxymethyl esters of N³-(4-methoxyfumaryl)-L-2,3-diaminopropanoic acid ('pro-drug'). In *Abstracts of The Multidisciplinary Conference on Drug Research*. Muszyna, Poland, P-76, 3-5 March, **1999**.
 99. Schwyzer R., Rittel W., Kappeler H., Iselin B., Synthese eines Nonadeka-peptides mit hoher corticotroper Wirksamkeit. *Angew. Chem.*, 72, 915-917, **1960**.
 100. Andruszkiewicz R., Koszel D., A simple access to O-acyl bicine. *Polish J. Chem.*, 81, 295-298, **2007**.
 101. Hassner A., Alexanian V., Direct room temperature esteryfication of carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.*, 46, 4475-4478, **1978**.
 102. Neises B., Steglich W., Simple method for esteryfication o carboxylic acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 17, 522-523, **1978**.
 103. Balas L., Jousseau B., Langwost B., Improved preparation of aliphatic propynoic esters. *Tetrahedron Lett.*, 30, 4525-4526, **1989**.
 104. Misra P.K., Hashmi S.A.N., Haq W., Katti S.B., 3-hydroxypropionitrile: A new reagent for carboxyl protection in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 30, 3569-3572, **1989**.
 105. Duralski A.A., Spooner P.J.R., Watts A., Synthesis of optically active polyunsaturated diacylglycerols. *Tetrahedron Lett.*, 30, 3585-3588, **1989**.
 106. Shioiri T., Ninomiya K., Yamada S., Diphenylphosphoryl azide. A new convenient reagent for a modified Curtis reaction and for the peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 6203-6205, **1972**.

107. Bergmann M., Zervas L., Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 65, 1192-1201, **1932**.
108. Kaliszan R., Nasal A., Buciński A., Chromatographic hydrophobicity parameter determined on an immobilized artificial membrane column. Relationships to standard measures of hydrophobicity and bioactivity. *Eur. J. Med. Chem.*, 29, 163-170, **1994**.
109. Ong S., Liu H., Pidgeon C., Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *J. Chromatogr. A*, 728, 113-128, **1996**.
110. Cheng Y.Y., Song J.C., Hanlan L., Pidgeon C., Immobilized artificial membranes – screens for drug membrane interactions. *Advanced Drug Delivery Rev.*, 23, 229-256, **1996**.
111. Noble A., Partition coefficients (*n*-octanol-water) for pesticides. *J. Chromatogr.*, 642, 3-14, **1993**.
112. Pidgeon C., and Venkataram U.V., Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids. *Anal. Biochem.*, 176, 36-47, **1989**.
113. Buszewski B., Schmid J., Albert K., Bayer E., Characterization of bonded phases by solid-state NMR spectroscopy. *J. Chromatogr.*, 552, 415-427, **1991**.