

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej

Rozprawa Doktorska

**Synteza potencjalnych inhibitorów
enzymatycznych szlaku kwasu
L- α -aminoadypinowego**

mgr inż. Marta Prokop

Promotor:

dr hab. inż. Maria J. Milewska, prof. nadzw. PG

GDAŃSK 2011

Składam serdeczne podziękowania:

mojej Promotor Pani dr hab. inż. Marii J. Milewskiej za opiekę naukową oraz pomoc podczas redagowania niniejszej rozprawy doktorskiej,

Pani dr inż. Iwonie Gabriel za wykonanie badań biochemicznych otrzymanych związków,

Pani dr hab. Magdalenie Śliwce-Kaszyńskiej oraz Pani dr inż. Katarzynie Kozłowskiej-Tylingo za wykonanie analizy i rozdziału związków techniką HPLC,

Natalii, Magdzie, Teresce i Oli za ciepłe słowa, wsparcie, uśmiech i miłą atmosferę podczas pracy,

moim Rodzicom i Siostrze Karolinie za wielkie wsparcie ♥;)

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE	9
1. WSTĘP TEORETYCZNY	11
1.1. Inhibitory enzymatyczne jako potencjalne leki i metody ich projektowania.....	11
1.2. Fluoroorganiczne inhibitory enzymatyczne	18
1.3. Enzymy szlaku kwasu α-aminoadypinowego jako potencjalne cele molekularne dla chemoterapii przeciwgrzybowej.....	23
1.3.1. Szlak kwasu <i>L</i> - α -aminoadypinowego.....	24
1.3.2. Inhibitory enzymów szlaku kwasu α -aminoadypinowego.....	25
1.3.2.1. Inhibitory dehydrogenazy sacharopiny.....	25
1.3.2.2. Inhibitory dehydrogenazy homoizocytrynianowej	27
1.4. Chemia kwasów homocytrynowego i homoizocytrynowego	31
1.4.1. Kwas homocytrynowy	31
1.4.2. Kwas homoizocytrynowy	40
2. CEL I ZAKRES PRACY.....	44
3. OMÓWIENIE UZYSKANYCH WYNIKÓW	45
3.1. Założenia racjonalnego projektowania i syntezy potencjalnych inhibitorów enzymów szlaku kwasu <i>L</i>-α-aminoadypinowego.....	45
3.1.1. Potencjalne inhibitory syntazy homocytrynianowej.....	45
3.1.2. Potencjalne inhibitory homoakonitazy	46
3.1.3. Potencjalne inhibitory dehydrogenazy homoizocytrynianowej.....	46
3.2. Opracowanie metod syntezy kwasów homocytrynowego i homoizocytrynowego ...	47
3.2.1. Synteza kwasu homocytrynowego	47
3.2.2. Synteza kwasu homoizocytrynowego	51
3.3. Opracowanie metod syntezy fluorowych analogów kwasów homocytrynowego i homoizocytrynowego.....	54
3.3.1. Metody wprowadzania atomu fluoru do związków organicznych i stosowane odczynniki fluorujące.....	54
3.3.2. Synteza potencjalnych inhibitorów z zastosowaniem odczynnika DAST	55
3.3.2.1. Synteza 2-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylanu trimetylu oraz jego homologu.....	57
3.3.2.2. Synteza (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-fluoro-3-metoksykarbonylowodoroadypinianu 1-metylu ..	61
3.3.3. Synteza bromopochodnych kwasu metylenocytrynowego oraz reakcje ich fluorowania z zastosowaniem TBAF i KF.....	63
3.3.4. Synteza kwasów <i>cis</i> - i <i>trans</i> -homoakonitynowych	65
3.3.5. Testowe reakcje fluorowania z wykorzystaniem elektrofilowych odczynników fluorujących	67
3.3.6. Synteza kwasów dikarboksylowych – potencjalnych inhibitorów dehydrogenazy homoizocytrynianu	68
3.4. Synteza 2-difluorometylolizyny	71

3.5. Kwasy 1,2-epoksy-1,2,3-propanotrikarboksylowe oraz 1,2-epoksy-1,2,4-butano- trikarboksylowe	74
3.6. Właściwości biologiczne otrzymanych związków.....	78
3.6.1. Aktywność przeciwgrzybowej zsyntezowanych związków	78
4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	82
4.1 Metody analityczne i warunki przygotowania niektórych odczynników do syntez.	82
4.1.1 Informacje ogólne	82
4.1.2 Warunki analizy HPLC	83
4.1.3. Odczynniki pomocnicze stosowane w syntezie.....	83
4.2. Synteza optycznie czynnego kwasu homocytrynowego	86
4.2.1. Kwas metylenocytrynowy.....	86
4.2.2. Bezwodnik kwasu metylenocytrynowego	86
4.2.3. Wodorometylenocytrynian metylu.....	87
4.2.4. Optycznie czynny wodorometylenocytrynian metylu	87
4.2.5. Chlorek monoestru metylowego kwasu metylenocytrynowego	87
4.2.6. Diazoketon.....	88
4.2.7. Metylenohomocytrynian dimetylu	89
4.2.8. Homocytrynian trimetylu.....	90
4.2.9. Homocytrynian trisodowy.....	90
4.2.10. Lakton kwasu homocytrynowego	91
4.3. Synteza kwasu (2<i>R</i>,3<i>S</i>)-homoizocytrynowego	91
4.3.1. <i>D</i> -Jabłczan dimetylu.....	91
4.3.2. (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- 3-Allilo-2-hydroksybursztynian dimetylu.....	92
4.3.3. (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-Acetoksy-3-allilobursztynian dimetylu.....	93
4.3.4. (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-Acetoksy-3-metoksykarbonylowodoroadypinian 1-metylu	93
4.3.5. Kwas (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-homoizocytrynowy	94
4.3.6. (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-Homoizocytrynian trimetylu.....	95
4.4. Synteza 2-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylanu trimetylu	95
4.4.1. Cytrynian trimetylu.....	95
4.4.2. 2-Fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylan trimetylu.....	96
4.5. Synteza homoakonitynianu trimetylu.....	97
4.5.1. Homoakonitynian trimetylu	97
4.5.2. <i>cis</i> -Homoakonitynian trisodowy	98
4.5.3. <i>trans</i> -Homoakonitynian tripotasowy.....	99
4.6. Synteza (2<i>R</i>,3<i>R</i>)-2-fluoro-3-metoksykarbonylowodoroadypinianu 1-metylu	99
4.6.1. (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-Allilo-2-hydroksybursztynian dimetylu.....	99
4.6.2. (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-Fluoro-3-allilobursztynian dimetylu.....	99
4.6.3. (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-Fluoro-3-metoksykarbonylowodoroadypinian 1-metylu	100
4.7. Synteza bromopochodnych metylenocytrynianu dimetylu	101
4.7.1. 2-Bromometylenocytrynian dimetylu	101
4.7.2. 2,2'-Dibromometylenocytrynian dimetylu	102
4.8. Kwasy alkilodikarboksylowe	103
4.8.1. (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-Allilojabłczan dipotasowy	103
4.8.2. (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-Propylojabłczan dimetylu	103

4.8.3. (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-Propylojabłczan dipotasowy	104
4.8.4. (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-Fluoro-3-allilobursztynian dipotasowy	104
4.8.5. (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-Fluoro-3-propylobursztynian dimetylu	104
4.8.6. (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-Fluoro-3-propylobursztynian dipotasowy	105
4.8.7. (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-Fluoro-3-butylobursztynian dimetylu	105
4.9. Synteza 2-difluorometylo-<i>L</i>-lizyny	106
4.9.1. Dichlorowodorek estru metylowego <i>L</i> -lizyny	106
4.9.2. (<i>S</i>)-2,6-Dibenzylidenoaminoheksanian metylu	106
4.9.3. 2,6-Dibenzylidenoamino-2-difluorometyloheksanian metylu	106
4.9.4. Dichlorowodorek estru metylowego 2-difluorometylolizyny.....	107
4.9.5. Dichlorowodorek 2-difluorometylolizyny.....	108
4.10. Kwasy 1,2-epoksy-1,2,3-propanotrikarboksyłowe oraz 1,2-epoksy-1,2,4-butano- trikarboksyłowe	108
4.10.1. Epoksyd <i>cis</i> -akonitynianu trimetylu.....	108
4.10.2. Epoksyd <i>cis</i> -akonitynianu tripotasowego.....	109
4.10.3. Epoksyd <i>trans</i> -akonitynianu trimetylu	109
4.10.4. Epoksyd <i>trans</i> -akonitynianu tripotasowego	110
4.10.5. Epoksyd <i>trans</i> -homoakonitynianu trimetylu	110
4.11 Metody oznaczania aktywności biologicznej	111
4.11.1 Określanie aktywności przeciwgrzybowej <i>in vitro</i>	111
4.11.2 Otrzymywanie preparatów enzymatycznych i określanie stopnia hamowania aktywności enzymów przez badane związki	113
PODSUMOWANIE I WNIOSKI	115
SPIS RYSUNKÓW	119
SPIS TABEL.....	121
WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO.....	122
SUMMARY	1225
BIBLIOGRAFIA.....	126

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AcCl	chlorek acetylu
AcCoA	acetylokoenzym A
Ac ₂ O	bezwodnik octowy
AcOEt	octan etylu
AcOH	kwasy octowy
Ala	alanina
All-Br	bromek allilu
All-I	jodek allilu
AMP	adenozyno-5'-monofosforan
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BH ₃ •SMe ₂	kompleks dimetylosulfidu i borowodoru
Bu ₃ SnH	wodorek tributyllocyny
Bzl	grupa benzylova
Cbz	grupa benzyloksykarbonylova
CDCl ₃	deuterokloroform
(CH ₂ O) _n	paraformaldehyd
DAST	<i>N,N</i> -dietyloaminotrifluorek siarki
DCC	<i>N,N</i> -dicykloheksylokarbodiimid
Deoksyfluor	bis(2-metoksyetylo)aminotrifluorek siarki
DFML	difluorometylolizyna
DFMO	difluorometyloornityna
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropylaoetyloamina
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetyloamino)pirydyna
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSO	dimetylosulfotlenek
eq.	ekwiwalent
Et	grupa etylowa
Et ₂ O	eter dietylowy
EtOH	etanol (alkohol etylowy)
Glu	kwasy glutaminowy
Gly	glicyna
h	godzina
HA	homoakonitaza
HCS	synteza homocytrynianowa

HD	dehydrogenaza homoizocytrynianowa
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Hz	herz, jednostka miary częstotliwości w układzie SI
IC _x	stężenie inhibitora, hamujące aktywność enzymu w x%
In(OTf) ₃	trifluorometanosulfonian indu
<i>i</i> -PrOH	2-propanol (alkohol izopropylowy)
kat.	katalizator
kJ	kilodżul, jednostka miary energii
LDA	<i>N,N</i> -diizopropylamidek litu
Leu	leucyna
LiHMDS	bis(heksametylosililo)amidek litu
Me	grupa metylowa
MeOH	metanol (alkohol metylowy)
MeONa	metanolan sodu
mesh	jednostka wielkości ziarna
MIC	minimalne stężenie hamujące (ang. <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
MHz	megaherc, jednostka miary częstotliwości
MS	spektrometria masowa (ang. <i>Mass Spectrometry</i>)
NAD ⁺	forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADH	forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADP ⁺	kation fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADPH	forma zredukowana NADP ⁺
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butylolit
PCC	chlorochromian pirydyny
PDC	dichromian pirydyny
<i>pH</i>	ujemny logarytm stężenia jonów hydroniowych
Ph	grupa fenyłowa
PhCH ₃	toluen
PhNMe ₂	<i>N,N</i> -dimetyloanilina
PhSCl	chlorek benzenosulfonowy
PP _i	nieorganiczny pirofosforan
ppm	jednostka przesunięcia chemicznego (ang. <i>parts per million</i>)
psi	jednostka ciśnienia
<i>p</i> -TosOH	kwask <i>p</i> -toluenosulfonowy
R _f	współczynnik podziału w chromatografii cienkowarstwowej

Selectfluor	bis(tetrafluoroboran) 1-chlorometylo-4-fluoro-1,4-diazobicyklo[2.2.2]-oktanu
SPE	ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>Solid Phase Extraction</i>)
TBAF	fluorek tetra- <i>n</i> -butyloammoniumowy
<i>t</i> -Bu	grupa <i>tert</i> -butylowa
TEA	trietyloamina
TFA	kwask trifluorooctowy
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>thin layer chromatography</i>)
TMSOK	trimetylosilanolan potasu
TMSOTf	trifluorometanosulfonian trimetylosililu
t.p.	temperatura pokojowa
tt	temperatura topnienia
tw	temperatura wrzenia
Å	angstrom, jednostka długości równa 10 ⁻¹⁰ m
<i>c</i>	stężenie
<i>ee</i>	nadmiar enancjomeryczny (ang. <i>enantiomeric excess</i>)
$[\alpha]_D^{20}$	skręcalność właściwa
α -KG	α -ketoglutaran
Δ	ogrzewanie do wrzenia – tzw. reflux
<i>J</i>	stała sprzężenia [Hz]
<i>N</i>	normalność
<i>M</i>	molarność
K_i	stała dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor
K_M	stała Michaelisa-Mentena
(r)	rozkład podczas temperatury topnienia
S_N1	substytucja nukleofilowa jednocząsteczkowa
S_N2	substytucja nukleofilowa dwucząsteczkowa
¹ H NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu protonowego
¹³ C NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu węglowego
¹⁹ F NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu fluorowego
<i>d</i>	dublet
<i>dd</i>	dublet dubletów
<i>m</i>	multiplet
<i>s</i>	singlet
<i>t</i>	triplet

STRESZCZENIE

W ramach realizacji tematu rozprawy doktorskiej zaprojektowano struktury i otrzymano szereg nowych związków o potencjalnym działaniu biologicznym będącym konsekwencją hamowania aktywności enzymów szlaku biosyntezy *L*-lizyny w komórkach grzybowych, w tym m.in.: a) pochodne kwasu cytrynowego: kwas 3-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylowy, kwas *trans*-akonitynowy oraz jego pochodną epoksydową; b) kwas homocytrynowy, homoizocytrynowy oraz ich pochodne, w tym kwas *cis*- i *trans*-homoakonitynowy i ich epoksydy, (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-metoksykarbonilowodoroadypinian 1-metylu, jak również pochodne dikarboksylowe z podstawnikami alkilowymi o różnym charakterze. Wybór w/w związków, jako potencjalnych inhibitorów enzymatycznych, oparty był na gruntownej analizie dotychczasowego stanu wiedzy dotyczącej struktur centrów aktywnych, spektrum substratowego i mechanizmów reakcji katalizowanych przez enzymy szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego, na analogiach do struktur znanych inhibitorów enzymów katalizujących inne reakcje metaboliczne, podobne do reakcji szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego oraz na ogólnych zasadach konstrukcji potencjalnych inhibitorów enzymatycznych.

Do syntezy deoksyfluoropochodnych stosowano odczynnik fluorujący DAST, w wyniku działania którego uzyskiwano efekt wymiany grupy hydroksylowej na atom fluoru. Przebadano także inne możliwości wprowadzania atomu fluoru w celu uzyskania pochodnych kwasu homocytrynowego i kwasu homoizocytrynowego, wykazując istotne ograniczenia stosowania tych metodyk dla tego rodzaju związków. Racemiczne pochodne epoksydowe kwasów akonitynowego i homoakonitynowego uzyskano w wyniku utleniania podwójnego wiązania z wykorzystaniem metody UHP oraz działania nadtlenkiem wodoru w obecności kwasu wolframowego. Ponadto przeprowadzono syntezę 2-difluorometylowego analogu *L*-lizyny (DFML). Metoda syntezy tego związku polegała na wprowadzeniu ugrupowania difluorometylowego na atom α -węgla w stosunku do grupy karboksylowej za pomocą chlorodifluorometanu.

Proponowane związki otrzymano w postaci wolnych kwasów oraz estrów. Zakładano, że związki w postaci estrów powinny łatwiej dyfundować przez błonę cytoplazmatyczną, natomiast wewnątrz komórek będą hydrolizowane przez esterazy do właściwych inhibitorów enzymatycznych.

Dla związków otrzymanych w postaci estrów metylowych określono aktywność przeciwgrzybową *in vitro* wobec kilku szczepów grzybowych. Większość związków nie wykazywała zdolności hamowania wzrostu badanych drobnoustrojów, natomiast (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-allylobursztynian dimetylu oraz (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-butylobursztynian dimetylu charakteryzowały się nieznaczną aktywnością przeciwgrzybową w stosunku do niektórych szczepów. Zdecydowanie najlepsze właściwości przeciwgrzybowe stwierdzono dla *trans*-homoakonitynianu trimetylu, który w stężeniach 16-32 µg/ml hamował wzrost wszystkich badanych drobnoustrojów w podłożu o składzie przypominającym warunki fizjologiczne. Określono również zdolność inhibicyjną związków uzyskanych w postaci soli w stosunku do enzymów szlaku kwasu *L*-α-aminoadypinowego. DFML hamował aktywność izoenzymu syntazy homocytrynianowej Lys22p w 40% przy stężeniu 4,2 mM, nie wpływając na aktywność drugiej izoformy tego enzymu, Lys21p. Zahamowanie aktywności, zarówno syntazy homocytrynianowej (IC₁₀ = 2,5mM dla Lys21-N-Hisp; IC₂₀ = 4,2 mM dla Lys22-N-Hisp), jak i dehydrogenazy homoizocytrynianowej (15% inhibicja przy stężeniu 5 mM) obserwowano dla soli dipotasowej kwasu (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-allylobursztynowego. Efekt hamowania aktywności dehydrogenazy homoizocytrynianowej w zakresie od 16 do 37% stwierdzono ponadto dla soli potasowych pochodnych epoksydowych kwasu akonitynowego, dla kwasu (2*S*,3*R*)-3-propylojabłkowego, kwasu (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-propylobursztynowego oraz kwasu (2*S*,3*R*)-3-allylojabłkowego oraz kwasu *trans*-homoakonitynowego (wszystkie związki w stężeniu 5 mM).

1. WSTĘP TEORETYCZNY

1.1. Inhibitory enzymatyczne jako potencjalne leki i metody ich projektowania

W obecnych czasach, w dobie rozwijających się chorób nowotworowych, zakażeń grzybiczych i wirusowych, chorób powodowanych przez pasożyty, ogromną rolę odgrywa poszukiwanie nowych i skutecznych leków. Na całym świecie laboratoria firm farmaceutycznych, biotechnologicznych, jak również ośrodków akademickich, prowadzą w tym celu szeroko zakrojone badania, polegające na zaprojektowaniu odpowiedniej struktury związku chemicznego o pożądanym działaniu biologicznym, jego syntezie i wprowadzeniu na rynek farmaceutyczny w postaci gotowego leku.

Istotnym etapem w badaniach nad nowymi lekami jest poszukiwanie tzw. struktury wiodącej (z ang. *lead compound*), czyli związku chemicznego, aktywnego biologicznie, otrzymanego na drodze syntezy chemicznej lub pochodzenia naturalnego. Jego źródłem mogą być: surowce naturalne, medycyna ludowa, związki syntetyczne, istniejące już leki, naturalne (fizjologiczne) ligandy i modulatory, synteza kombinatoryczna, projektowanie wspomagane komputerowo, czysty przypadek, komputerowe banki danych strukturalnych oraz racjonalne projektowanie z wykorzystaniem technik modelowania molekularnego.

Nie mniej ważne niż poszukiwanie ‘struktury wiodącej’ jest optymalizowanie struktury potencjalnego leku. Podejście to polega na znalezieniu analogu strukturalnego związku wyjściowego o lepszych właściwościach. Jest to na ogół postępowanie wieloetapowe.

Projektowanie związków aktywnych biologicznie jest obecnie realizowane już na poziomie molekularnym, na którym ich cząsteczki oddziałują z receptorami najczęściej białkowymi, głównie z enzymami. Duża część badań poświęcona jest zatem projektowaniu i syntezie nowych inhibitorów, które skutecznie i selektywnie hamowałyby aktywność enzymów, przeprowadzających reakcje istotne dla życia komórek patogennych. Możliwość wykonania oznaczeń aktywności inhibicyjnej związków chemicznych wobec enzymów wytypowanych jako cele molekularne w chemoterapii stanowi ważny element strategii poszukiwania leków znanej pod nazwą uwarunkowanej procedury przesiewowej (ang. *directed screening*). Tego typu postępowanie, znacznie przyspiesza i ułatwia proces odkrywania nowych

chemoterapeutyków. Jednak pozytywny efekt biologiczny związany z oddziaływaniem substancji z wybranym receptorem komórkowym, często enzymem nie gwarantuje skuteczności jej działania. Dzieje się tak ze względu na fakt, że na efekt biologiczny badanego związku mają wpływ również inne czynniki jak, np.: zastosowana dawka leku, wchłanianie i transport substancji aktywnej, wiązanie się w komórce, dystrybucja w organizmie, metabolizm oraz drogi wydalania.

Projektując potencjalne inhibitory enzymatyczne, będące analogami strukturalnymi dla substratów reakcji enzymatycznych, dokonuje się zwykle stosunkowo niewielkich zmian w strukturze tych cząsteczek. Duże podobieństwo pomiędzy analogiem a substratem sprzyja wiązaniu się tego pierwszego zamiast substratu z odpowiednim receptorem. Czasami jednak taka nieznaczna różnica w budowie powoduje, że substrat będzie wypierał inhibitor z centrum aktywnego enzymu. Wówczas wiązanie się substratu i inhibitora jest procesem konkurencyjnym i odwracalnym, a efekt biologiczny działania inhibitora jest niewielki.

Inhibitory enzymatyczne są często analogami substratu. Mogą być jednak analogami stanu przejściowego reakcji enzymatycznej, analogami koenzymu lub naturalnego inhibitora allosterycznego. Znanych jest wiele sposobów klasyfikacji inhibitorów enzymatycznych.

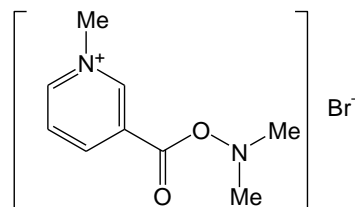
Ze względu na sposób działania wyróżnia się:

✓ *Analogi substratu wiążące się w sposób odwracalny*

Wiele inhibitorów wiąże się przejściowo i odwracalnie z centrum aktywnym enzymu, prowadząc jedynie do przejściowego zahamowania jego aktywności. Podobieństwo w budowie powoduje, że inhibitor konkuruje z substratem o miejsce w centrum wiążącym enzymu. Wzrost stężenia substratu niweluje wówczas efekt inhibitora. Szczególnie silne wiązanie inhibitora – analogu substratu - z enzymem ma miejsce wówczas, gdy cząsteczka inhibitora jest **izosteryczna** i **izoelektronowa** z cząsteczką substratu, czyli zachowana zostaje geometria i rozkład ładunku elektrycznego. Oba warunki zostają spełnione przy wymianie grupy hydroksylowej na atom fluoru. Wymiana atomu wodoru na atom fluoru nie spełnia warunku izoelektronowości, natomiast wymiana grupy hydroksylowej na grupę tiolową zmienia lokalną geometrię cząsteczki.

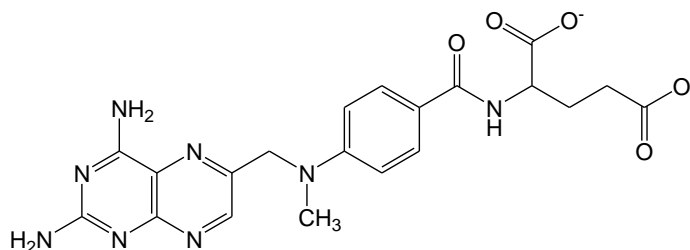
Przykładem analogu substratu - inhibitora kompetytywnego - jest bromek pirydostygminy **I** (*Mestinon*). Jest to lek z grupy inhibitorów acetylocholinoesterezy,

najbardziej znany i stosowany w leczeniu miasteni – niedowładu mięśni szkieletowych.¹ Klasycznymi analogami substratu są chemoterapeutyki z grupy sulfonamidów, będące analogami kwasu *p*-aminobenzoowego. Do grupy tej należą również alkilowe i aryłowe sulfonamidy *cis*-2,6-dimetylopiperydyny, jako potencjalne terapeutyki w leczeniu choroby Alzheimerera.²



Mestinson (I)

Lek przeciwnowotworowy Metotreksat **II** jest inhibitorem kompetytywnym dla reduktazy dihydrofolianowej, który katalizuje redukcję dihydrofolianu do tetrahydrofolianu. Metotreksat jest analogiem strukturalnym folianu.³



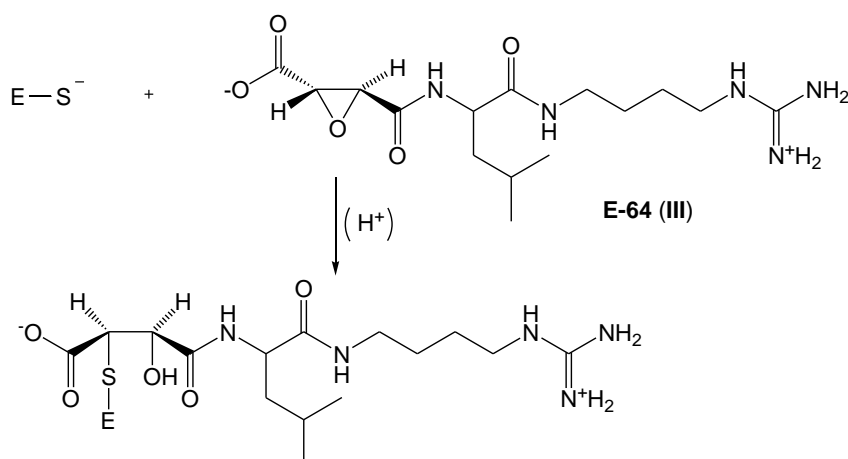
Metotreksat (II)

✓ *Inhibitory tworzące kowalencyjne wiązania z centrami aktywnymi enzymów*

Wiele inhibitorów tworzy kowalencyjne wiązanie z grupami funkcyjnymi w centrum aktywnym enzymu, co prowadzi do powstania trwałego kompleksu enzym-inhibitor. Związki te w sposób nieodwracalny modyfikują cząsteczkę białka, hamują reakcję enzymatyczną, skutecznie uniemożliwiając substratowi dojście do miejsca wiążącego enzymu.

Projektowany inhibitor enzymatyczny powinien cechować się specyficnością działania, czyli możliwością łączenia się z centrum aktywnym tylko określonego enzymu. Można tego dokonać poprzez zachowanie analogii pomiędzy fragmentami w strukturze cząsteczki inhibitora i cząsteczki substratu, odpowiedzialnymi za rozpoznawanie i interakcję z miejscem wiążącym odpowiedniego białka. Ponadto inhibitor powinien wykazywać się reaktywnością. Efekt ten uzyskuje się poprzez wprowadzenie do cząsteczki związku organicznego ugrupowań chemicznie

reaktywnych (reszty chlorometylo- lub bromometyloketonowe, diazowe, pierścień epoksydowy bądź atomy fluorowców w położeniu allilowym), które będą tworzyć wiązania kowalencyjne z grupami tiolowymi, hydroksylowymi lub aminowymi reszt aminokwasowych, wchodzących w skład cząsteczki enzymu. Metodą tą otrzymuje się szereg kowalencyjnych inhibitorów enzymatycznych, np.: podstawiając grupę karboksylową C-końcowego aminokwasu peptydu resztą chlorometyloketonową, uzyskuje się selektywne inhibitory enzymów proteolitycznych m. in. elastazy czy katepsyny G. Niestety ze względu na wysoką toksyczność związków zawierających grupy chlorometyloketonowe, ich stosowanie w chemoterapii jest wykluczone. Innym przykładem nieodwracalnych inhibitorów wiążących się kowalencyjnie może być antybiotyk E-64 (**III**) wyizolowany z *Aspergillus japonicum*, zawierający resztę epoksydową, która reaguje z grupami tiolowymi proteaz cysteinowych – papainy, bromelainy i ficyny.⁴ Schemat reakcji przedstawiono na Rysunku 1.



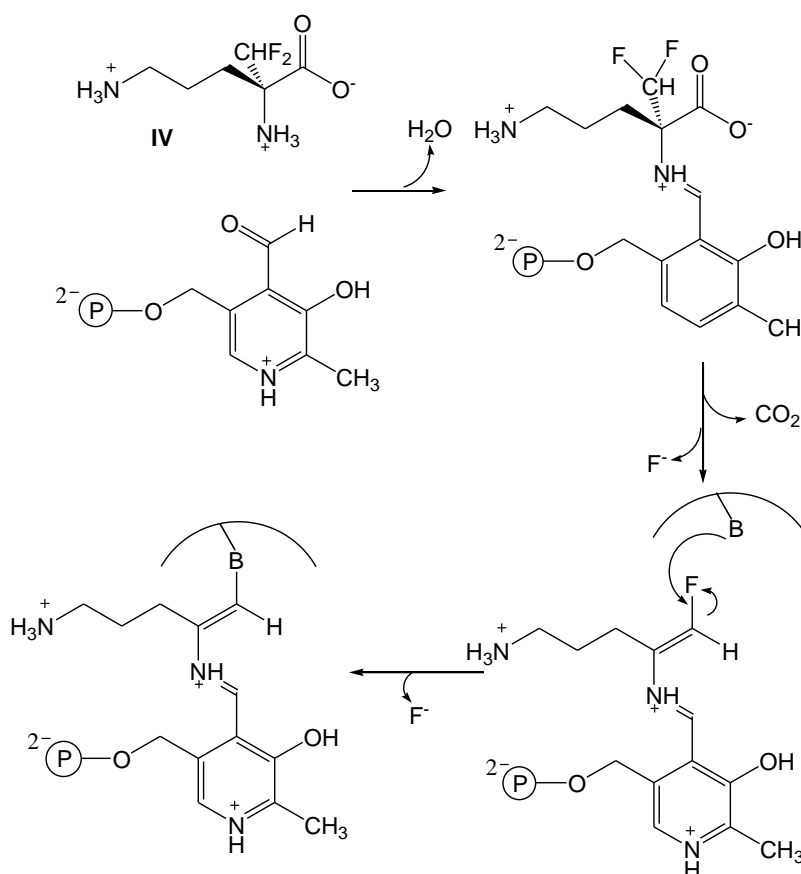
Rysunek 1. Reakcja antybiotyku E-64 z grupą tiolową w centrum katalitycznym proteiny cysteinowej papainy.⁴

✓ *Inhibitory samobójcze*

Nazwą tą określa się związki, które w wyniku katalizy enzymatycznej są przekształcane w aktywne inhibitory dezaktywujące enzym. Związki tego typu reagują z enzymem podobnie jak inhibitory konkurencyjne i powodują całkowite, nieodwracalne unieczynnienie enzymu. Do tej klasy inhibitorów należą substancje, które zawierają grupy acetylenowe, szybko przekształcane w centrach katalitycznych enzymów w silnie reaktywne ugrupowania allenowe (skumulowane wiązanie podwójne), w wyniku oderwania protonu z cząsteczki substratu,⁵ jak również analogi aminokwasów zawierające ugrupowanie α -difluorometylowe. Oczywiście, podczas

projektowania struktury takich związków istotna jest dobra znajomość mechanizmu reakcji enzymatycznej, ponieważ ulegają one takim samym reakcjom co substrat.

Przykładem nieodwracalnego inhibitora samobójczego jest difluorometyloornityna **IV** (DFMO), która hamuje aktywność dekarboksylazy ornityny. Enzym ten pełni istotną rolę w komórkach ssaków oraz innych organizmów eukariotycznych. Katalizuje pierwszy, ważny etap szlaku biosyntezy poliamin, mianowicie reakcję dekarboksylacji ornityny, w wyniku której powstaje putrescyna, diaminowy prekursor biosyntezy poliamin.^{6,7} W wyniku obecności DFMO dochodzi do wyczerpania wewnątrz komórek putrescyny i jej pochodnej spermidyny (Rysunek 2).⁸ DFMO, stosowana w leczeniu śpiączki afrykańskiej, powodowanej przez *Trypanosoma brucei*, jest przykładem substancji leczniczej otrzymanej w wyniku racjonalnego projektowania inhibitora enzymatycznego.

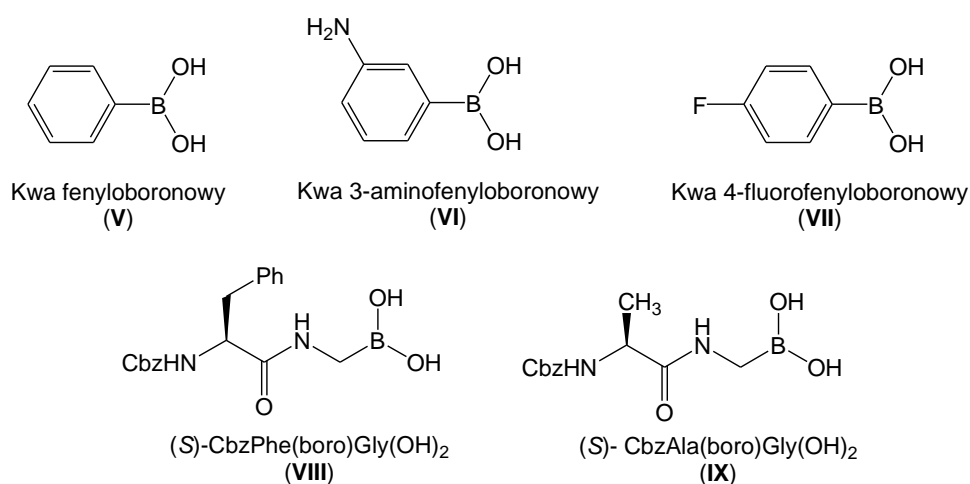


Rysunek 2. Mechanizm inaktywacji dekarboksylazy ornitynowej przez DFMO.

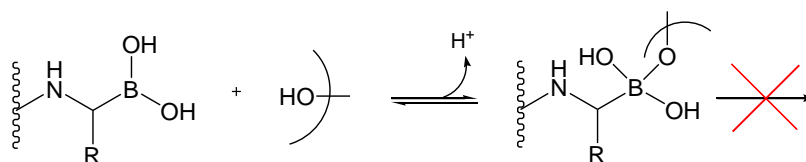
✓ *Analogi stanów przejściowych reakcji enzymatycznych*

Są to związki chemiczne o strukturze naśladowującej wysokoenergetyczne, nietrwałe stany przejściowe tworzące się podczas reakcji enzymatycznej w wyniku

przekształcenia się substratu. Mogą być one silnie i nieodwracalnie związane w centrum aktywnym enzymu, blokując jego działanie. Analogi wysokoenergetycznych stanów przejściowych są z reguły bardzo silnymi i selektywnymi inhibitorami. Przykładem mogą być boronowe inhibitory enzymów proteolitycznych, występujących w układzie żołądkowo-jelitowym, takich jak: trypsyna, chymotrypsyna, elastaza i luecynoamino-peptydaza.⁹ Pochodne kwasów boronowych są wyjątkowo silnymi inhibitorami proteaz, ponieważ grupa boronowa naśladuje strukturę tetraedrycznego stanu przejściowego reakcji hydrolizy enzymatycznej wiązania peptydowego.¹⁰



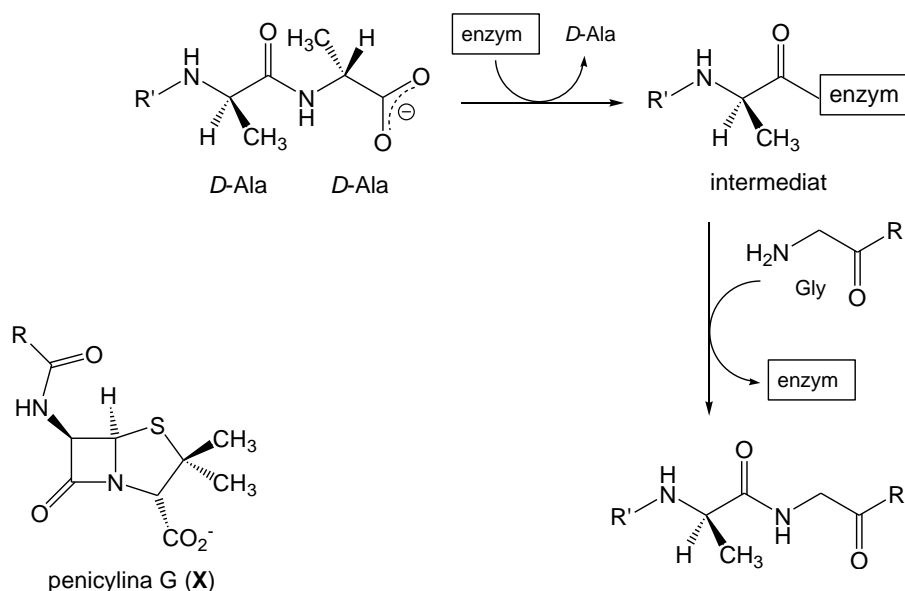
Z przeprowadzonych badań wynika,^{11,12} że sposób wiązania się określonego inhibitora boronowego do centrum aktywnego enzymu zależy od stopnia dopasowania struktury inhibitora do fizjologicznego lub naturalnego substratu proteazy serynowej. W przypadku, gdy kwas boronowy jest dobrym „naśladowcą” substratu, wówczas tworzenie się tetraedrycznego kompleksu przejściowego z resztą seryny jest uprzywilejowane (Rysunek 3).



Rysunek 3. Zasada działania boronowych inhibitorów enzymów proteolitycznych.

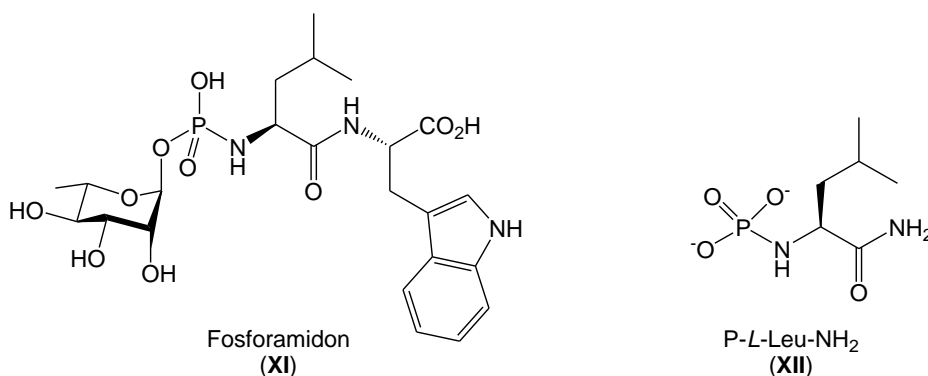
Odkryty przez Aleksandra Fleminga antybiotyk przeciwbakteryjny penicylina G (X) modyfikuje kowalencyjnie centrum aktywne peptydylotransferazy glikopeptydów, wiążąc się efektywnie z centrum aktywnym tego enzymu, dzięki analogii strukturalnej

do stanu przejściowego tworzącego się podczas katalizowanej przez enzym transpeptydacji z udziałem reszty *D*-alanylo-*D*-alaniny.

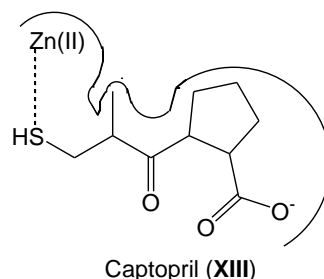


✓ *Inhibitory chelatujące jony metalu*

Projektowanie inhibitorów dla enzymów metalozależnych polega na stworzeniu takiej struktury, która będzie efektywnie chelatować jon metalu, będący częścią centrum katalitycznego cząsteczki danego białka. W tym celu należy poznać dokładną budowę miejsca aktywnego enzymu oraz jaką funkcję pełni dany jon metalu w reakcji katalitycznej. Najszerzej badaną grupą w/w inhibitorów są inhibitory metaloproteaz, enzymów z jodem cynku w swojej strukturze. Syntezowane inhibitory posiadają więc odpowiednie grupy funkcyjne, które mają za zadanie kompleksowanie jonu cynku. Przykładem mogą być cynkozależne inhibitory - peptydowe inhibitory termolizyny, stromelizyny lub innych metaloproteaz, zawierające ligandy w postaci reszty kwasu hydroksamowego oraz grup tiolowych, fosforanowych i fosfonowych.^{13,14,15} Do tego typu związków należy między innymi fosforamidon (XI) i pochodna leucyny (XII).



Szczególną rolę w regulacji ciśnienia krwi odgrywa układ trzech substancji znajdujących się w ludzkim organizmie: renina-angiotensyna-aldosteron (RAA). Renina hydrolizuje znajdujący się we krwi angiotensynogen, uwalniając tzw. angiotensynę I. Enzym konwertujący angiotensynę (ACE) przekształca ją w angiotensynę II, powodując tym samym skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych i wzrost ciśnienia krwi.^{16,17} Przeciwnie do angiotensyny działa bradykinina, która ma zdolność uwalniania do naczyń krwionośnych substancji rozkurczających. Konwertaza angiotensyny rozkłada bradykininę do nieaktywnych metabolitów.¹⁸ Bardzo ważne okazało się zastosowanie odpowiednich inhibitorów konwertazy angiotensyny, których podobieństwo strukturalne do substratu – angiotensyny, umożliwia ich wiązanie się w centrum aktywnym białka ACE i zahamowanie jego aktywności. W związku z tym, że angiotensyna wiąże się z enzymem przy udziale jonu cynku, przy projektowaniu inhibitorów ACE istotne okazało się wprowadzenie do ich struktury grup takich, jak np.: karboksylowe czy tiolowe, które będą kompleksowały jony cynku. Najszerzej stosowanym w leczeniu nadciśnienia tętniczego krwi inhibitorem enzymu ACE jest związek o nazwie Captopril.



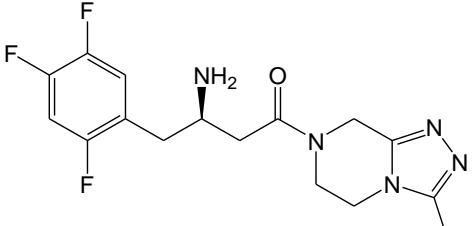
1.2. Fluoroorganiczne inhibitory enzymatyczne

Związki fluorowane są obecnie szeroko wykorzystywane w chemii medycznej. Około 20-25% wszystkich leków to związki zawierające w swojej strukturze co najmniej jeden atom fluoru.¹⁹ Rozwój badań nad związkami fluorowanymi, charakteryzującymi się polepszoną stabilnością w przemianach metabolicznych oraz specyficnością działania, sprzyja wiązaniu się fluoropochodnych do miejsc docelowych większej ilości cząsteczek i poszerza liczbę leków o strukturze fluoroorganicznej. Atom fluoru jest zbliżony wielkością do atomu wodoru ($F = 1,35$; $H = 1,1\text{\AA}$).²⁰ Tym samym, związek otrzymany w wyniku wymiany jednego z tych atomów na drugi, jest izosteryczny ze związkiem wyjściowym. Z drugiej strony, ponieważ atom fluoru charakteryzuje się największą elektroujemnością spośród

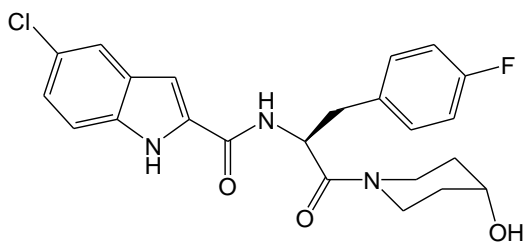
wszystkich pierwiastków układu okresowego, stąd obecność podstawnika fluorowego bądź wiązania C-F w związku organicznym, zmienia jego właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne, m. in.:

- ✓ ze względu na wysoką energię wiązania C-F (447,7 kJ/mol), związki fluorowane są trudniej metabolizowane; dzieje się tak w sytuacji, gdy w reakcji enzymatycznej dochodzi do odszczepiania protonu z substratu. Jeżeli proton zastąpi się atomem fluoru, wówczas nie ma możliwości odrywania protonu. W konsekwencji prowadzi to do kompetytywnej inhibicji enzymu, np.: kwas 2-fluorocytrynowy jest inhibitorem kompetytywnym akonitazy w cyklu kwasu cytrynowego;²¹
- ✓ zmienia się lipofilowość i moment dipolowy związku fluorowanego;
- ✓ obecność atomu fluoru może istotnie wpływać na konformację cząsteczki;
- ✓ związki fluorowane wykazują często zwiększone powinowactwo wiązania się do białka docelowego;²²
- ✓ względnie mały rozmiar atomu fluoru ma istotne znaczenie podczas wymiany grupy hydroksylowej atomem fluoru i prowadzi do niewielkiej zmiany zasadniczej wielkości i kształtu cząsteczki przy zachowaniu miejscowego momentu dipolowego, przez co zwiększa się reaktywność związku fluorowanego. Taka sytuacja poprawia stabilność termiczną i oksydacyjną uzyskiwanych związków w układach biologicznych.²³

Związki organiczne, zawierające fluor, są często wykorzystywane jako leki w leczeniu m.in. chorób centralnego układu nerwowego, rozmaitych schorzeń sercowo naczyniowych, otyłości, jako środki przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe (Tabela 1) oraz w terapii przeciwgrzybowej.^{24,25,26}

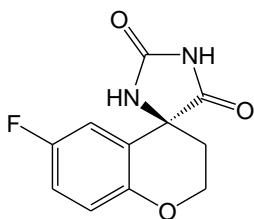
Podział fluorowanych leków i ich zastosowanie	Przykłady leków
<p style="text-align: center;">Fluorowane leki stosowane w leczeniu cukrzycy i otyłości (lit.^{27, 28, 29})</p>	<p style="text-align: center;"><i>Inhibitor dipeptydylopeptydazy IV</i></p> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">Sitagliptyna (XIV)</p>

Inhibitor fosforylasy glikogenu

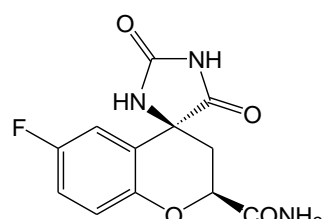


CP-320626 (XV)

Inibitory reduktazy aldozy



Sorbinil (XVI)

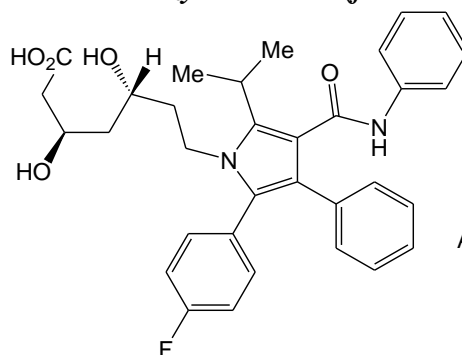


Fidarestat (XVII)

**Fluorowane leki
w terapii chorób
sercowo-naczyniowych**
(lit.^{30,31,32,33})

1. Hiperlipidemia (choroba związana z nadmiarem cholesterolu we krwi)

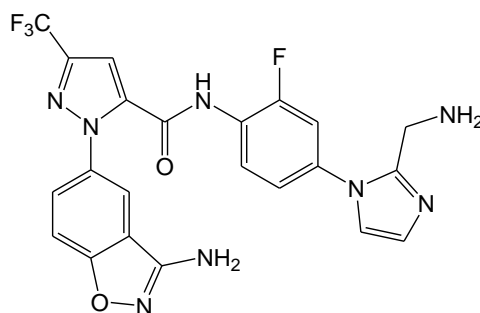
Inhibitor reduktazy HMG-CoA (fluorostatyny)



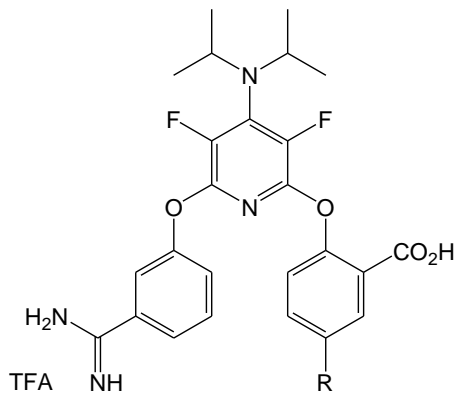
Atorwastatyna (XVIII)
(Lipitor)
 $IC_{50} = 8 \text{ nM}$
Typ 2 statyny

2. Fluorowane antykoagulanty

Inhibitor czynnika Xa i FVIIa/TF



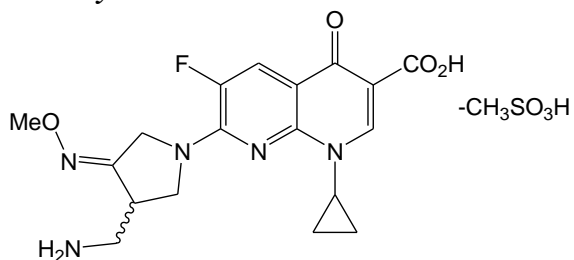
Razaxaban (XIX)
 $K_i = 0,15 \text{ nM}$



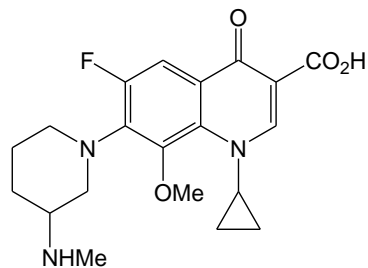
(XX) R = Ph; IC₅₀ = 36 nM
 (XXI) R = CONHCH₂-*p*-C₆H₄Cl; IC₅₀ = 16 nM

**Fluorowane środki
o działaniu
przeciwbakteryjnym**
(lit. ^{34,35,36,37,38})

Fluorochinolony

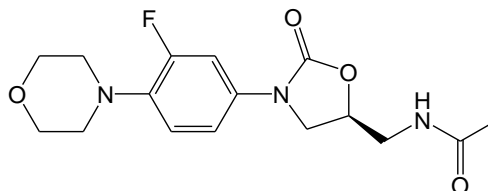


Gemifloxacin (XXII)



Balofloxacin (XXIII)

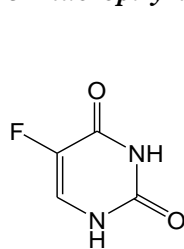
Fluorowane oksazolidyny



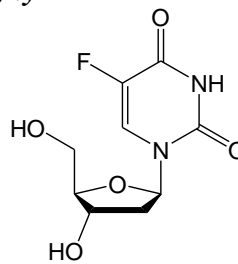
Linezolid (XXIV)

**Fluorowane środki
o działaniu
przeciwnowotworowym**
(lit. ^{25,39})

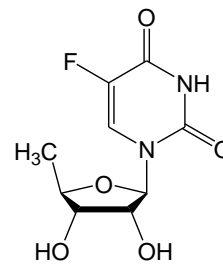
5-Fluoropirymidyny



5-fluorouracyl
(XXV)



floxuridine (FdUrd)
(XXVI)



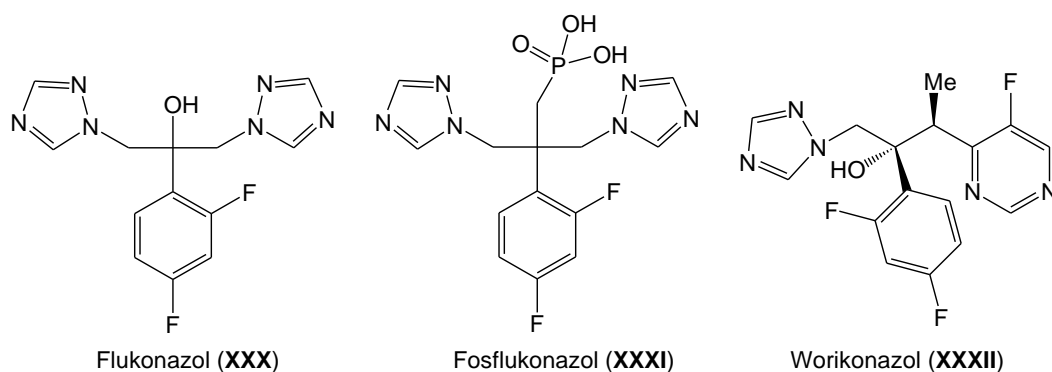
furtulon (5'dFUrd)
(XXVII)

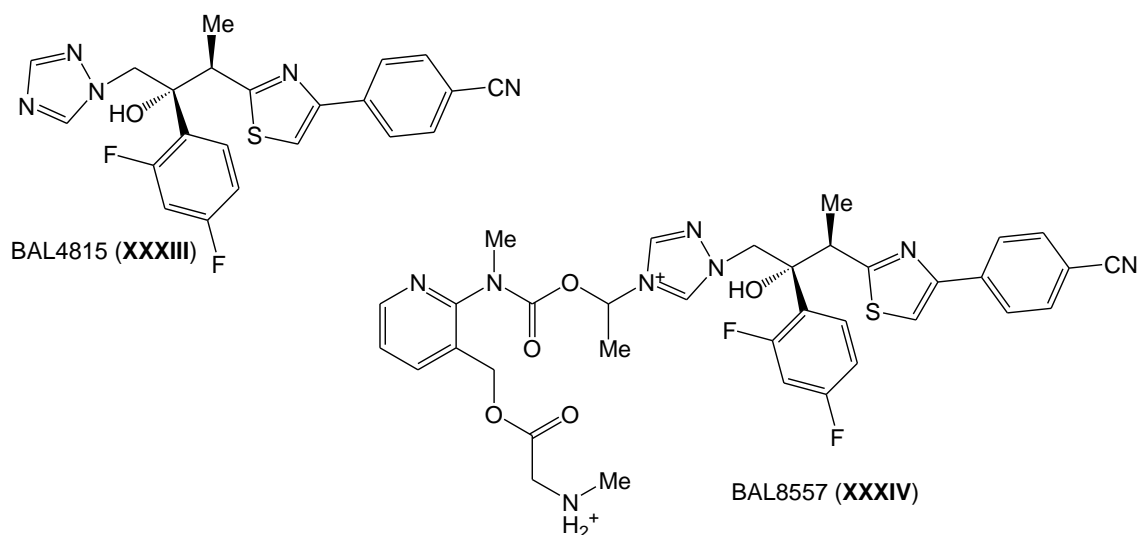
<p><i>Inne: :</i></p> <p style="text-align: center;">Clofarabine (XXVIII)</p> <p style="text-align: center;">Gemcitabine, dFdC (XXIX)</p>

Tabela 1. Zestawienie niektórych leków fluorowanych stosowanych w medycynie.

Fluorowane środki azolowe o działaniu przeciwgrzybowym

W ostatnich latach dokonano znacznego postępu w leczeniu grzybic, ciężkich infekcji wywołanych przez grzyby chorobotwórcze. Skuteczne, zarówno terapeutycznie, jak i profilaktycznie, okazały się być związki z grupy azoli. Działanie preparatów azolowych polega na hamowaniu aktywności cytochromu P450 komórek grzybowych w szlaku biosyntezy ergosterolu, istotnego składnika budulcowego błony komórkowej drobnoustrojów grzybowych. Szczególne zainteresowanie wiąże się z azolami fluorowanymi. Przykładem takiego leku przeciwgrzybicznego jest Flukonazol, bardzo skuteczny w leczeniu ciężkich grzybic układowych. Dużą zaletą pochodnych fluorowanych azoli, w porównaniu z niefluorowanymi, jest ich dobra rozpuszczalność w wodzie, a co za tym idzie ich lepsza wchłanianość z przewodu pokarmowego.¹⁹ Innymi fluorowanymi lekami azolowymi są m.in. fosfloflukonazol, worikonazol oraz BAL4815, jego prolek BAL8557. Worikonazol jest efektywnym inhibitorem enzymu 14- α -demetylazy zależnej od cytochromu P450 w szlaku biosyntezy ergosterolu.⁴⁰ Natomiast BAL4815 (Isawukonazol) oraz jego prolek BAL8557 są lekami przeciwgrzybowymi, które aktualnie znajdują się w III fazie badań klinicznych.⁴¹





1.3. Enzymy szlaku kwasu α -aminoadypinowego jako potencjalne cele molekularne dla chemoterapii przeciwgrzybowej

Choroby powodowane przez drobnoustroje grzybowe stanowią narastający problem kliniczny. Należą do nich grzybice układowe wywoływane przez grzyby pleśniowe z rodzaju *Aspergillus* oraz drożdżaki z rodzaju *Cryptococcus* i *Candida*,⁴² zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością układu immunologicznego np. z powodu zakażenia wirusem HIV, po różnego rodzaju chemioterapiach przeciwnowotworowych czy stosowaniu środków immunosupresyjnych po transplantacji organów.^{43,44}

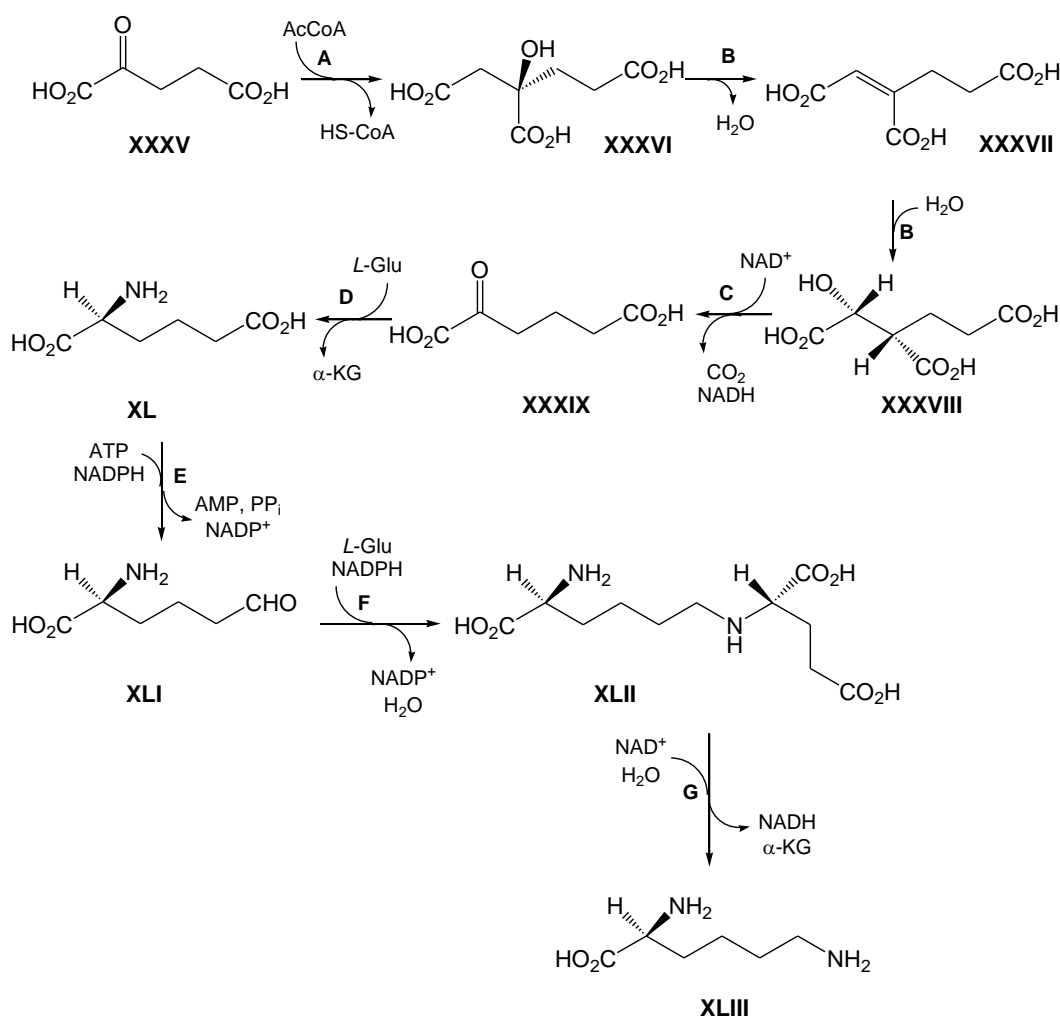
Leczenie grzybic narządowych jest bardzo trudnym zadaniem ze względu na trudności w identyfikacji powstałych zakażeń grzybiczych. Ograniczeniem jest również wąska gama skutecznych leków przeciwgrzybowych o szerokim spektrum działania, możliwie niskotoksycznych dla człowieka i niepowodujących oporności wielolekowej. W ostatnich latach wprowadzono do lecznictwa tylko dwa nowe leki przeciwgrzybowe: worikonazol (XXXII) i kaspofunginę. Oba chemoterapeutyki wykazują szeroki zakres działania i są skuteczne w inwazyjnych zakażeniach wywołanych przez *Aspergillus* i *Candida*. Poza tym kaspofungina wydaje się być najlepsza jakościowo ze względu na mechanizm działania, który polega na zahamowaniu syntezy β -1,3 *D*-glukanu, jednego z głównych składników ściany komórkowej grzybów.⁴⁵

Obecnie nadal poszukuje się nowych celów molekularnych dla chemoterapeutyków przeciwgrzybowych. Wśród nich są enzymy szlaku biosyntezy aminokwasów, występujących w komórkach grzybowych. Największe zainteresowanie wzbudzają

enzymy katalizujące początkowe reakcje szlaku biosyntezy *L*-lizyny, zwanego również szlakiem kwasu *L*- α -aminoadypinowego.

1.3.1. Szlak kwasu *L*- α -aminoadypinowego

Szlak kwasu *L*- α -aminoadypinowego składa się z ośmioetapowej reakcji, katalizowanej przez siedem różnych enzymów. Kilka pierwszych etapów tego szlaku wykazuje duże podobieństwo do cyklu Krebsa (kwasów tricarboksylowych – TCA). Natomiast początkowe produkty pośrednie szlaku biosyntezy lizyny są prostymi homologami „intermediatów” cyklu kwasu cytrynowego, zawierającymi o jeden atom węgla więcej w swojej cząsteczce (Rysunek 4).⁴⁶



Rysunek 4. Szlak kwasu α -aminoadypinowego biosyntezy lizyny u grzybów wyższych: (A) syntaza homoizocytrynianowa EC. 4.1.3.21; (B) homoakonitaza EC 4.2.1.36; (C) dehydrogenaza homoizocytrynianowa EC 1.1.1.87; (D) aminotransferaza kwasu α -aminoadypinowego EC 2.6.1.39; (E) reduktaza kwasu α -aminoadypinowego EC 1.2.1.31; (F) reduktaza sacharopiny EC 1.5.1.10; (G) dehydrogenaza sacharopiny EC 1.5.1.7.

Biosynteza lizyny w organizmach grzybowych zaczyna się od powstania kwasu homocytrynowego (XXXVI), w wyniku kondensacji kwasu α -ketoglutazarowego

(XXXV) z acetylo-CoA przy udziale syntazy homocytrynianowej. Związek ten ulega następnie reakcji dehydratacji, przechodząc w kwas *cis*-homoakonitynowy (XXXVII)* i dalszemu przekształceniu w kwas homoizocytrynowy (XXXVIII). Obie reakcje katalizowane są przez homoakonitazę. Kwas homoizocytrynowy, w obecności dehydrogenazy homoizocytrynianowej, jest jednocześnie utleniany i dekarboksylowany do kwasu α -ketoadypinowego (XXXIX), tracąc grupę karboksylową w pozycji C3. Następnie aminotransferaza kwasu α -aminoadypinowego przenosi aminową grupę kwasu glutaminowego na powstały ketokwas, w wyniku czego powstaje kwas α -aminoadypinowy (XL). Druga część szlaku polega na redukcji reszty karboksylowej łańcucha bocznego kwasu α -aminoadypinowego i powstaniu pochodnej δ -semi-aldehydowej (XLI). Reakcja ta przebiega przy udziale reduktazy kwasu α -aminoadypinowego, która wymaga do katalizy ATP i NADPH. Powstały semialdehyd XLI, przy udziale reduktazy sacharopiny, jest kondensowany z cząsteczką kwasu glutaminowego i jednocześnie redukowany do *L*-sacharopiny (XLII). Ostatni etap szlaku kwasu α -aminoadypinowego polega na rozerwaniu wiązania C-N w glutaminowym końcu sacharopiny i jest katalizowany przez dehydrogenazę sacharopiny. W rezultacie reakcja ta prowadzi do powstania *L*-lizyny (XLIII).⁴⁶

1.3.2. Inhibitory enzymów szlaku kwasu α -aminoadypinowego

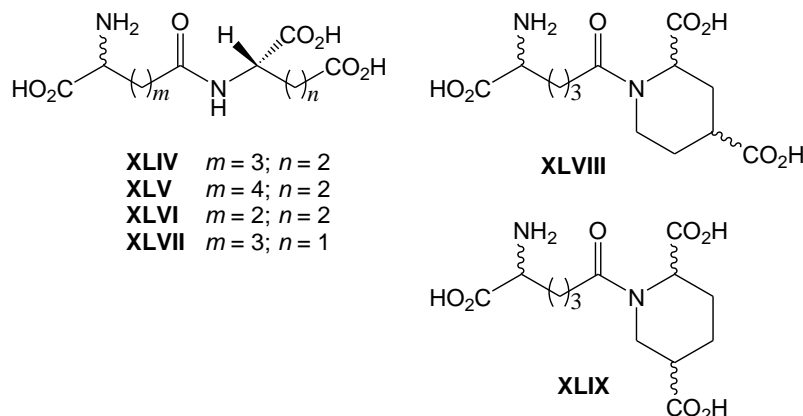
L-Lizyna jest aminokwasem niezbędnym do życia, niesyntetyzowanym w organizmie człowieka i dlatego musi być dostarczana wraz z pożywieniem. W przypadku organizmów grzybowych lizyna jest istotnym związkiem otrzymywanym w komórkach. Niektóre bakterie, drożdże, grzyby wyższe, również te patogenne dla człowieka z rodzaju *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* oraz patogeny roślinne z rodzaju *Magnaphore grisea*, są zdolne syntetyzować *L*-lizynę, wykorzystując szlak kwasu α -aminoadypinowego.⁴⁷ Dzięki temu, szlak kwasu α -AA jest rozważany jako potencjalne źródło nowych celów molekularnych w badaniach nad nowymi lekami o działaniu przeciwgrzybowym.

1.3.2.1. Inhibitory dehydrogenazy sacharopiny

Pierwsze próby w tym kierunku podjęli Zabriskie i Jackson w roku 2000.⁴⁶ Otrzymali oni amidowe analogi strukturalne sacharopiny różniące się długością

* w/w nazewnictwo nienasyconych kwasów trikarboksylowych i ich pochodnych jest tradycyjnie stosowane w naukowej literaturze biochemicznej i medycznej

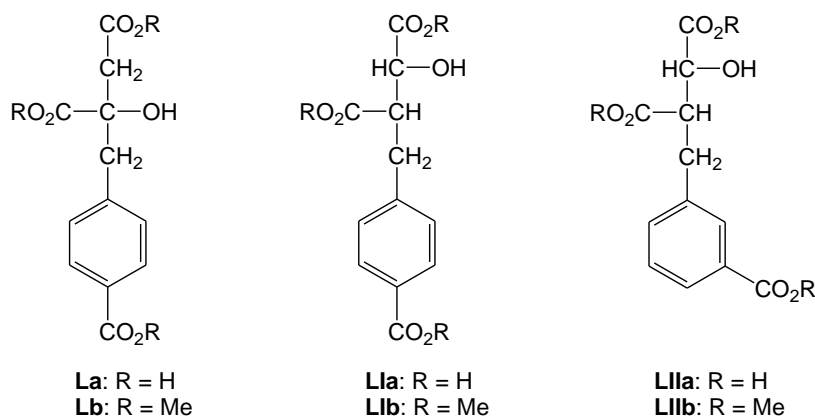
łańcuchów bocznych (Rysunek 5). Uzyskane związki przebadano pod względem aktywności inhibicyjnej w stosunku do enzymu izolowanego ze szczepu *Saccharomyces cerevisiae*, gdzie początkowe stężenia substratów reakcji enzymatycznej wynosiły: 2mM, 1,7mM oraz 0,33mM, odpowiednio dla badanego związku, sacharopiny i NAD⁺.



Rysunek 5. Potencjalne inhibitory dehydrogenazy sacharopiny.

Spośród zsyntetyzowanych analogów sacharopiny, tylko związek **XLIV** silnie hamował aktywność dehydrogenazy sacharopiny ($K_i = 0,12\text{mM}$), natomiast **XLV** był średnim inhibitorem. Niestety żaden z powyższych inhibitorów nie odznaczał się aktywnością przeciwgrzybową w stosunku do szczepów *S. cerevisiae* i *C. albicans*.⁴⁶

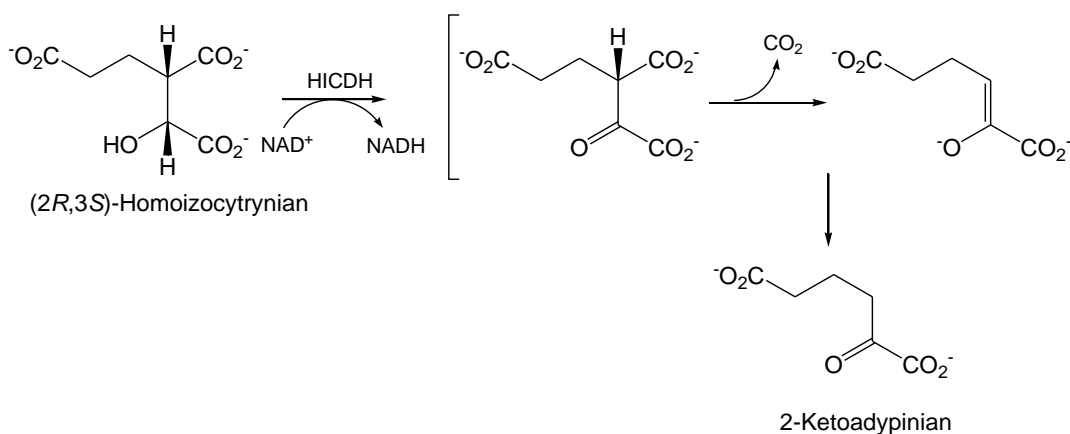
Kilka lat później, Palmer i in.⁴⁷ zaprezentowali analogi (*R*)-homocytrynianu (**L**) i (*2R,3S*)-homoizocytrynianu z podstawnikiem karboksyfenylowym (**LI-LII**), które skutecznie hamowały wzrost grzyba *Aspergillus nidulans*. Autorzy zaznaczyli, że dzięki podobieństwu otrzymanych związków chemicznych do struktury odpowiednich metabolitów szlaku α -AA mogą one hamować aktywność enzymów początkowych etapów szlaku biosyntezy *L*-lizyny: homoakonitazy i/lub dehydrogenazy homoizocytrynianowej.



Okazało się, że estry (**L-LIb**) powodują zahamowanie wzrostu grzyba *A. nidulans* w 50% w stężeniach ok. 3mM.

1.3.2.2. Inhibitory dehydrogenazy homoizocytrynianowej

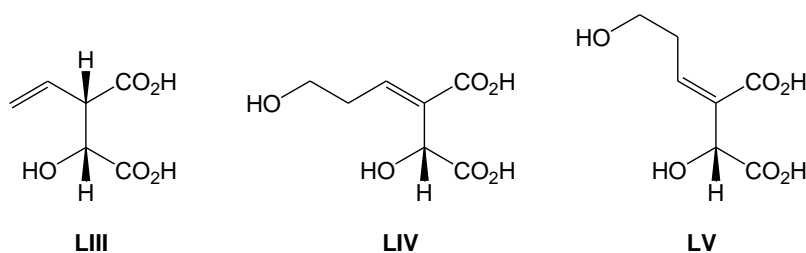
Dehydrogenaza homoizocytrynianowa (HICDH, EC 1.1.1.87) uczestniczy w trzecim etapie szlaku kwasu α -aminoadypinowego. Enzym ten przeprowadza reakcję oksydacyjnej dekarboksylacji (2*R*,3*S*)-homoizocytrynianu do 2-ketoadypinianu, przy udziale NAD^+ (Rysunek 6).

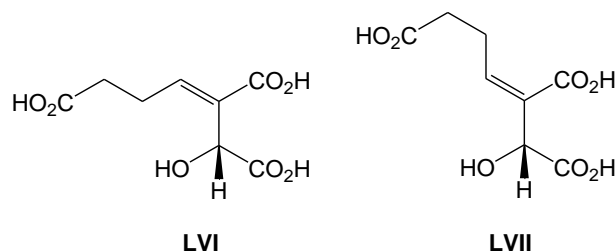


Rysunek 6. Reakcja oksydacyjnej dekarboksylacji katalizowana przez HICDH.

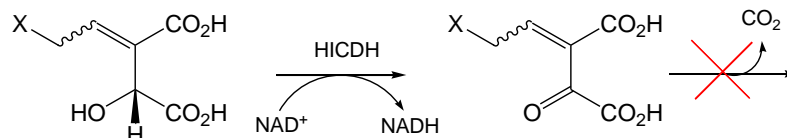
W 2007 roku Yamamoto i in.⁴⁸ przeprowadzili badania, polegające na projektowaniu struktur analogów substratów oraz inhibitorów dehydrogenazy homoizocytrynianowej. Doświadczenia realizowano z wykorzystaniem dehydrogenazy homoizocytrynianowej, wyizolowanej ze szczepu *Deinococcus radiodurans* (DraHICDH) oraz *Saccharomyces cerevisiae* (SchICDH).

W oparciu o mechanizm reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę homoizocytrynianową (Rysunek 6), zaprojektowano struktury cząsteczek potencjalnych inhibitorów tego enzymu. Wśród nich znalazły się pochodne: winylowa (**LIII**) oraz alkilidenowe kwasu jabłkowego (**LIV-LVII**).





Zakładano, że nie będą one podatne na reakcję dekarboksylacji, natomiast będą wiązać się z centrum aktywnym enzymu (Rysunek 7).



Rysunek 7. Proponowany mechanizm reakcji zachodzącej w obecności inhibitorów HICDH.

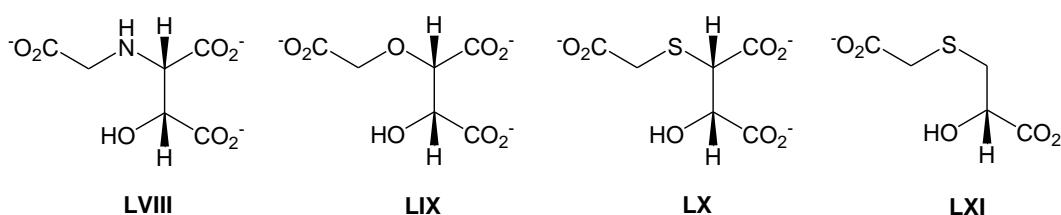
Otrzymane związki chemiczne przebadano pod kątem aktywności inhibicyjnej. Okazało się, że kwas 3-winylojabłkowy (**LIII**) jest znakomitym kompetywnym inhibitorem DraHICDH. W przypadku ScHICDH nie obserwowano tego typu aktywności. Kwas 3-winylojabłkowy wykazuje wyższe powinowactwo do dehydrogenazy homoizocytrynia-nowej z *D. radiodurans*. Prawdopodobnie istotną przyczyną tego stanu jest obecność podwójnego wiązania oraz jego umiejscowienie w cząsteczce związku. Powoduje to silne oddziaływanie π -elektronów wiązań podwójnych z resztami aminokwasowymi HICDH lub pierścieniem nikotynamidowym koenzymu NAD^+ .⁴⁸ Ponadto wszystkie z zsyntetyzowanych związków z podstawnikiem alkilidenylowym (**LIV-LVII**) zachowują się jak kompetytywne inhibitory, umiarkowanie hamując działalność enzymu i powodują jego inaktywację. Wbudowują się odwracalnie do miejsca aktywnego dehydrogenazy homoizocytrynianowej, w wyniku czego nieoczekiwanie uniemożliwiają enzymowi przeprowadzenie pierwszej reakcji – utleniania grupy hydroksylowej, znajdującej się w ich cząsteczce. Najsilniejszym inhibitorem HICDH okazał się kwas 3-karboksy-1-propylidenojabłkowy (**LVII**) (Tabela 2).

Inhibitor	K_i (μM)	
	DraHICDH	ScHICDH
LIII	88	Brak
LIV	5200	1400
LV	15,300	510
LVI	3100	790
LVII	260	72

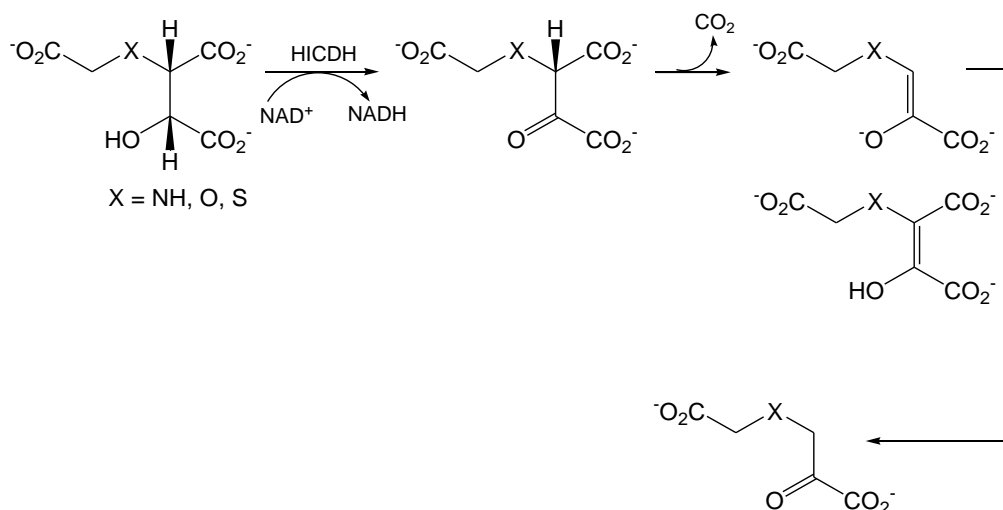
Tabela 2. Stałe inhibicji kompetytywnej omawianych związków; brak – nie obserwowano aktywności inhibicyjnej.

W badaniach inhibicji zaobserwowano także znaczne różnice w zdolności hamowania aktywności enzymatycznej przez odpowiednie izomery geometryczne (*Z/E*). Izomery *Z* odznaczały się silniejszą zdolnością inhibicyjną (z wyjątkiem kwasu 3-hydroksy-1-propylidenojabłkowego) w stosunku do ScHICDH. Tłumaczy to fakt, że konfiguracja *Z* łańcuchów bocznych otrzymanych inhibitorów, znakomicie naśladuje konformację wydłużonego łańcucha substratu enzymu – homoizocytrynianu (**XXXVIII**).⁴⁸

Rok później, opublikowano wyniki badań dotyczące nowego, silnego inhibitora dehydrogenazy homoizocytrynianowej – tiahomoizocytrynianu.⁴⁹ Zaprojektowano pochodne homoizocytrynianu zawierające na atomie węgla C3 podstawniki z heteroatomami takimi, jak tlen, siarka czy azot (**LVIII-LX**) oraz związek **LXI** pozbawiony grupy ω-karboksylowej.



W czasie reakcji enzymatycznej, katalizowanej przez HICDH, cząsteczka związku przekształcana jest w przejściową formę enolową, która jest stabilizowana przez obecność heteroatomu w swojej strukturze (Rysunek 8). W wyniku tego wiąże się z centrum aktywnym enzymu i hamuje jego działanie.



Rysunek 8. Reakcja katalizowana przez HICDH z substratami, zawierającymi heteroatom w swojej cząsteczce.⁴⁹

Uzyskane racemiczne analogi (**LVIII-LXI**) poddano reakcjom enzymatycznym z udziałem dehydrogenazy homoizocytrynianowej, izolowanej ze szczepu *Saccharomyces*

cerevisiae (ScHICDH). Przebieg reakcji monitorowano przez pomiar tworzenia się NADH z NAD⁺. Dane kinetyczne zamieszczono w Tabeli 3.

związek	K_i (μM)	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})
LVIII	—	150	2.0
LIX	10	20	0.59
LX	0.097	b.d.	b.d.
LXI	12 ^a	—	—
XXXVIII (HIC)		18 ^b	17 ^b

Tabela 3. Stałe kinetyczne aktywności HICDH dla badanych związków:

b.d. = brak danych-wartości nie określono w warunkach pomiaru ze względu na niską aktywność substratową
(^a inhibitor niekompetytywny,⁴⁹ ^b dane z bibliografii⁴⁸)

Zaobserwowano, że obecność atomu tlenu czy siarki, odpowiednio w związku **LIX** i **LX**, sprzyja wiązaniu się ich w centrum aktywnym dehydrogenazy homoizocytrynianowej zamiast substratu – homoizocytrynianu. Pochodne te, a w szczególności pochodna tiohomoizocytrynianowa **C** ($K_i = 97\text{nM}$), działają więc jak kompetytywne inhibitory ScHICDH. Doświadczenia, w których badano ilość powstającego NADH, w zależności od stężenia siarkowego analogu substratu, wykazały, że etapem limitującym szybkość reakcji enzymatycznej jest utlenianie tiopochodnej przez NAD⁺.⁴⁹

Biorąc pod uwagę mechanizm inhibicji HICDH z udziałem tioorganicznej pochodnej **LX**, Yamamoto i in.⁴⁹ stwierdzili, że produkt reakcji **LXI** może również hamować aktywność enzymu.

Badania kinetyczne wykazały, że przy różnych stężeniach substratu (HIC) oraz kofaktora NAD⁺, związek **LXI** jest silnym inhibitorem niekompetytywnym ($K_i=12\mu\text{M}$) dehydrogenazy homoizocytrynianowej, izolowanej ze szczepu *Saccharomyces cerevisiae*.⁴⁹

W literaturze naukowej brak informacji na temat substancji, które charakteryzowałyby się aktywnością inhibicyjną w stosunku do pozostałych enzymów szlaku kwasu α -aminoadypinowego. Stwarza to możliwość projektowania nowych obiecujących związków organicznych o właściwościach inhibicyjnych, w tym analogów strukturalnych kwasu homocytrynowego i homoizocytrynowego, które mogłyby być inhibitorami enzymów katalizujących trzy pierwsze reakcje szlaku kwasu α -aminoadypinowego.

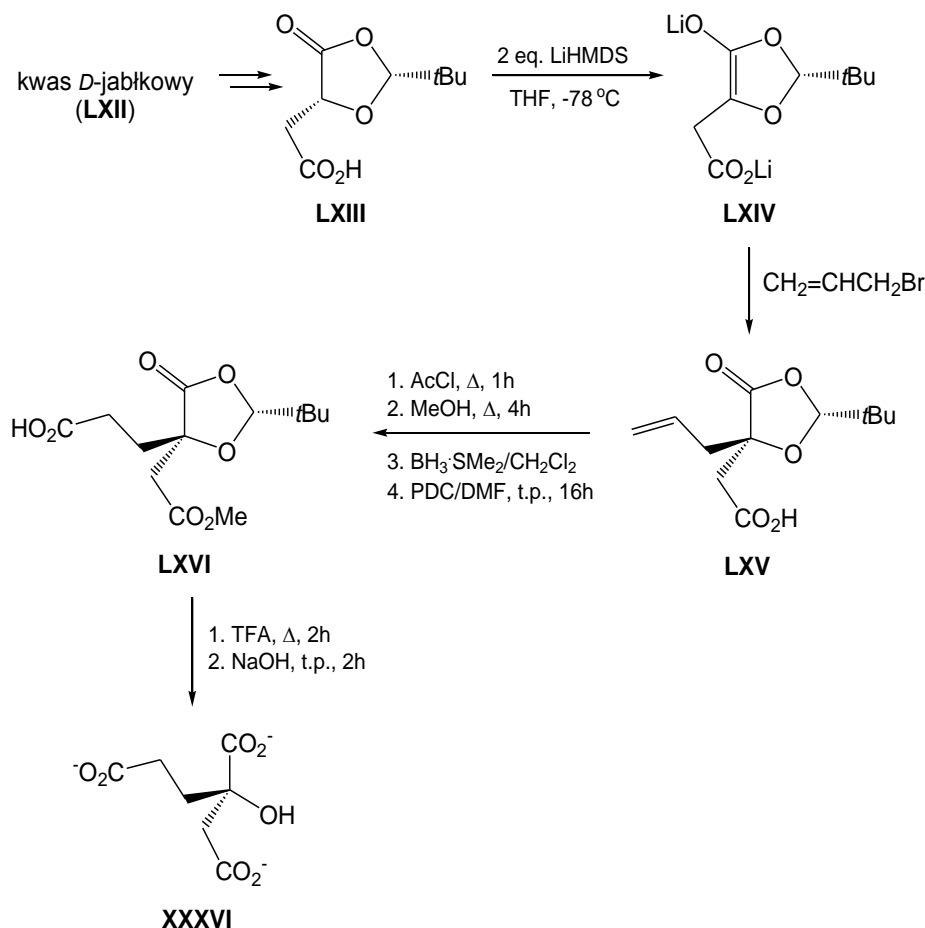
1.4. Chemia kwasów homocytrynowego i homoizocytrynowego

1.4.1. Kwas homocytrynowy

Kwas β -hydroksy- β -karboksydypinowy (kwas 2-hydroksy-1,2,4-butanotrikarboksylowy), znany bardziej pod nazwą – kwas homocytrynowy, jest naturalnym intermediatem szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego biosyntezy *L*-lizyny, występującego u drożdży i grzybów wyższych. Związek ten jest wytwarzany w organizmach żywych, na drodze enzymatycznej kondensacji α -ketoglutaranu i acetyloCoA. Enzym biorący udział w tej reakcji to syntaza homocytrynianowa EC 4.1.3.21 (Rysunek 4, str. 24).⁵⁰

Znanych jest kilka metod syntezy kwasu homocytrynowego **XXXVI**. Większość z nich umożliwia jednak otrzymywanie raczej γ -laktonu kwasu homocytrynowego w postaci racemicznej, rzadziej jako związek optycznie czysty.

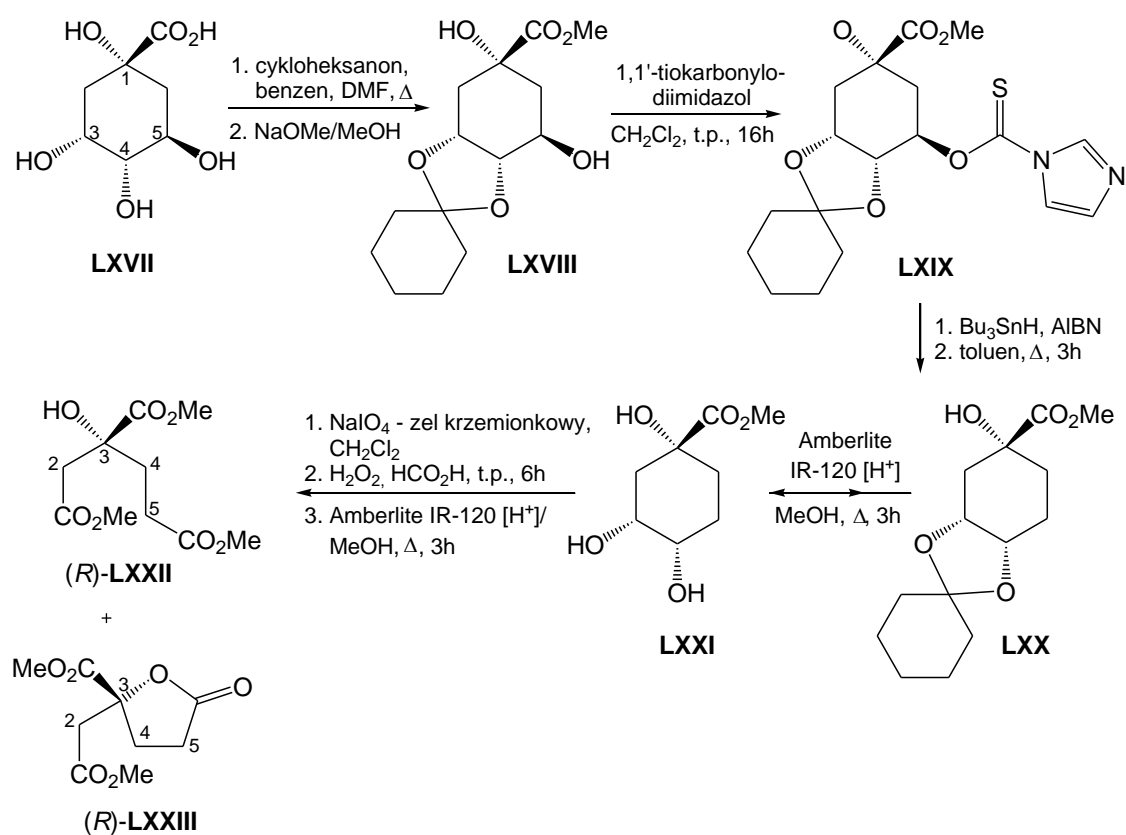
Pierwsza asymetryczna synteza kwasu (*R*)-homocytrynowego⁵¹ wykorzystuje reakcję diastereoselektywnego alkilowania enolanu litu za pomocą bromku allilu (Rysunek 9).



Rysunek 9. Metoda otrzymywania (*R*)-homocytrynianu trisodowego z kwasu *D*-jabłkowego.

Substratem w tym procesie jest kwas *D*-jabłkowy, który został przekształcony w pochodną 2-*tert*-butylo-1,3-dioksolan-5-onu (**LXIII**). W soli litowej enolanu **LXIV** atom α -węgla jest planarny, co umożliwia jego alkirowanie od strony przeciwnej do dużej grupy ochronnej. Alkirowanie enolanu bromkiem allilu przebiega z ponad 95% diastereo selektywnością. Pochodną dioksolanonu **LXV** poddaje się reakcji estryfikacji, a następnie hydroborowania ($\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$) i utleniania za pomocą PDC, otrzymując dioksolanon **LXVI**, będący pochodną kwasu homocytrynowego. Usunięcie grup ochronnych prowadzi do powstania (*R*)-homocytrynianu trisodowego (Rysunek 9).

W 2006 roku opisano syntezę optycznie czynnego estru trimetylowego kwasu homocytrynowego w mieszaninie z jego γ -laktone m przebiegającą wg schematu przedstawionego na Rysunek 10.⁵²

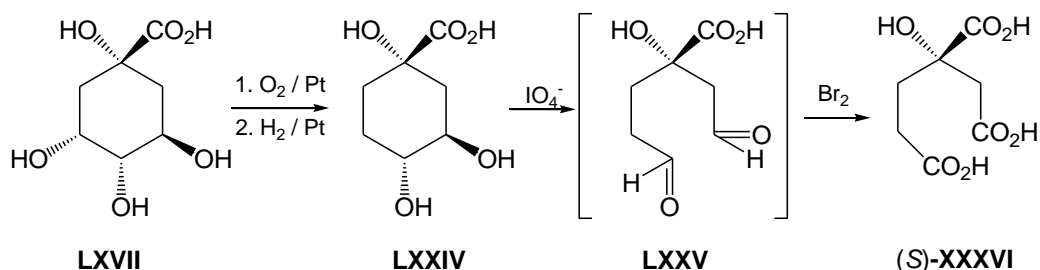


Rysunek 10. Synteza optycznie czynnego estru trimetylowego kwasu homocytrynowego, wykorzystująca kwas chinowy jako substrat.

Źródłem centrum stereogenicznego na atomie węgla C3 produktu **LXXII** jest kwas chinowy (**LXVII**), w którym selektywnie usuwano grupę hydroksylową z atomu węgla C5, a następnie oksydacyjnie rozszczepiano pierścień nadjodanem sodu.⁵² Dwie wicynalne grupy *cis*-hydroksylowe kwasu **LXVII** były chronione poprzez utworzenie pochodnej alkilidenu (**LXVIII**) z cykloheksanonem. W dalszym etapie, związek

LXVIII przekształcano w pochodną typu tiouretanowego **LXIX** w reakcji z tiokarbonylodiimidazolem. Usuwanie ugrupowania tiouretanowego przeprowadzono działając na pochodną **LXIX** wodorkiem tributyllocynowym w obecności AIBN (2,2'-azobisisobutyronitryl). Otrzymany w ten sposób związek **LXX**, po usunięciu ochrony cykloheksylidenowej (tworzy się triol **LXXI**), utleniano nadjodanem sodu oraz nadkwasem mrówkowym do homocytrynianu 3-metylu. Bez izolacji monoestru, mieszaninę poreakcyjną traktowano metanolem w obecności jonitu Amberlit IR120[H⁺]. Ostatecznie otrzymano mieszaninę dwóch produktów: (*R*)-homocytrynianu trimetylu **LXXII** oraz estru dimetylowego γ -laktonu kwasu (*R*)-homocytrynowego (**LXXIII**), odpowiednio z wydajnościami 36 i 15%.⁵²

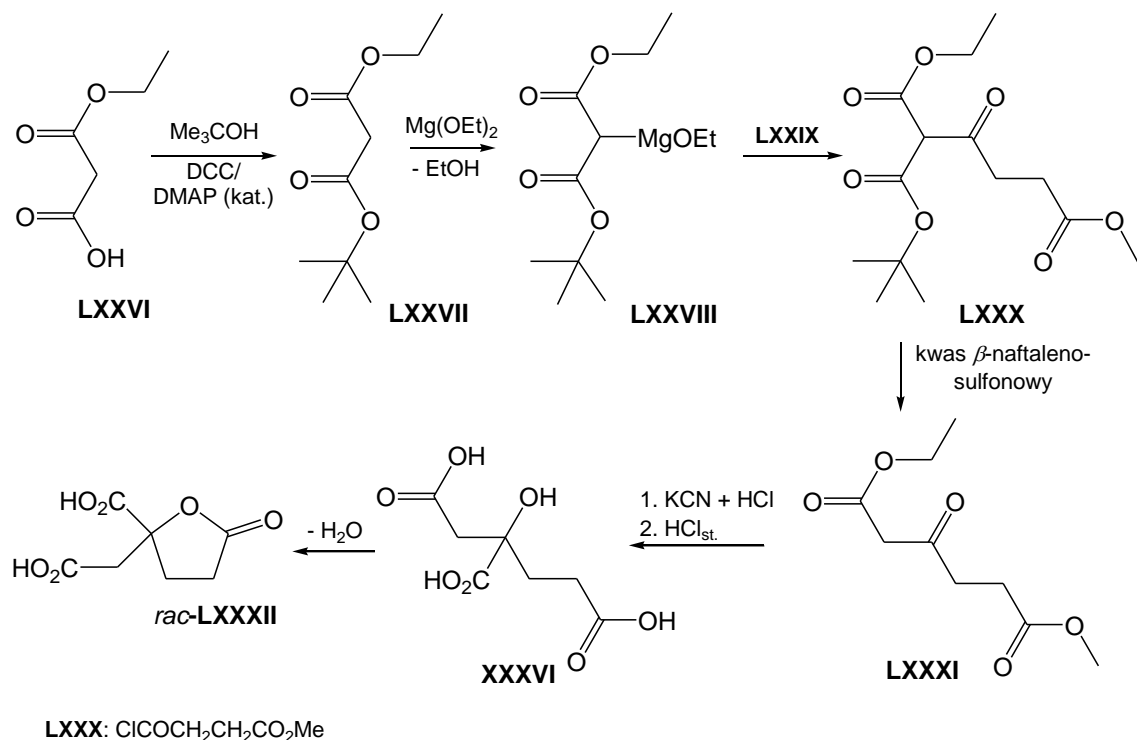
Podobny schemat syntezy wcześniej zaproponowali Thomas i współ.,⁵³ którzy także wychodzili z optycznie czynnego kwasu chinowego **LXVII**, przekształcając go w reakcji utleniania, a następnie redukcji w kwas dehydroksychinowy (**LXXIV**). Działając na związek **LXXIV** nadjodanem otrzymali dialdehyd (**LXXV**), który następnie utleniali wodą bromową do kwasu homocytrynowego **XXXVI** (Rysunek 11).



Rysunek 11. Utlenianie kwasu (-)-chinowego do kwasu homocytrynowego.

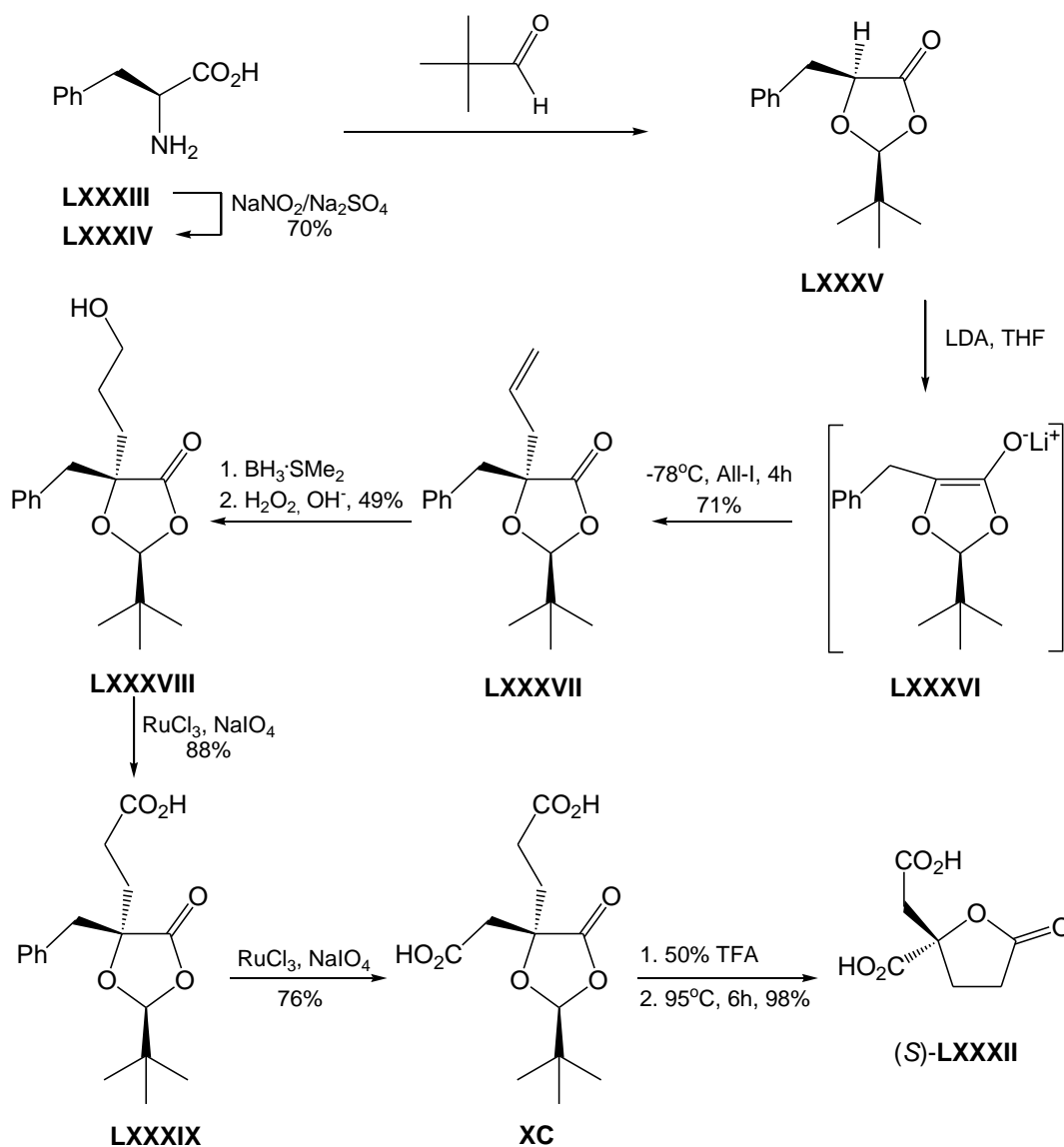
Racemiczny kwas homocytrynowy **XXXVI** otrzymano w reakcji soli magnezowej malonianu **LXXVIII** z monochlorkiem monoestru metylowego kwasu bursztynowego **LXXIX** (Rysunek 12).⁵⁴ Substrat, malonian *tert*-butyloetylowy **LXXVII** otrzymano poprzez estryfikację wodoromalonianu monoetylu (**LXXVI**) alkoholem *tert*-butylowym w obecności dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) oraz 4-dimetyloamino-pirydyny (DMAP). Uzyskany w ten sposób malonian *tert*-butyloetylowy (**LXXVII**) przeprowadzono w sól magnezową **LXXVIII** i poddano reakcji acylowania chlorkiem kwasowym **LXXIX**. Po usunięciu *tert*-butylowej grupy ochronnej działaniem kwasu β -naftalenosulfonowego i dekarboksylacji, otrzymany β -ketoadypinian **LXXXI** poddano reakcji addycji cyjanowodorem (KCN + HCl). Uzyskano w efekcie wolny

kwasy *rac*-homocytrynowy (*rac*-**XXXVI**), który jednak jest izolowany w ostatnim etapie jako γ -lakton *rac*-**LXXXII**.



Rysunek 12. Metoda syntezy kwasu homocytrynowego z malonianu monoetylu.

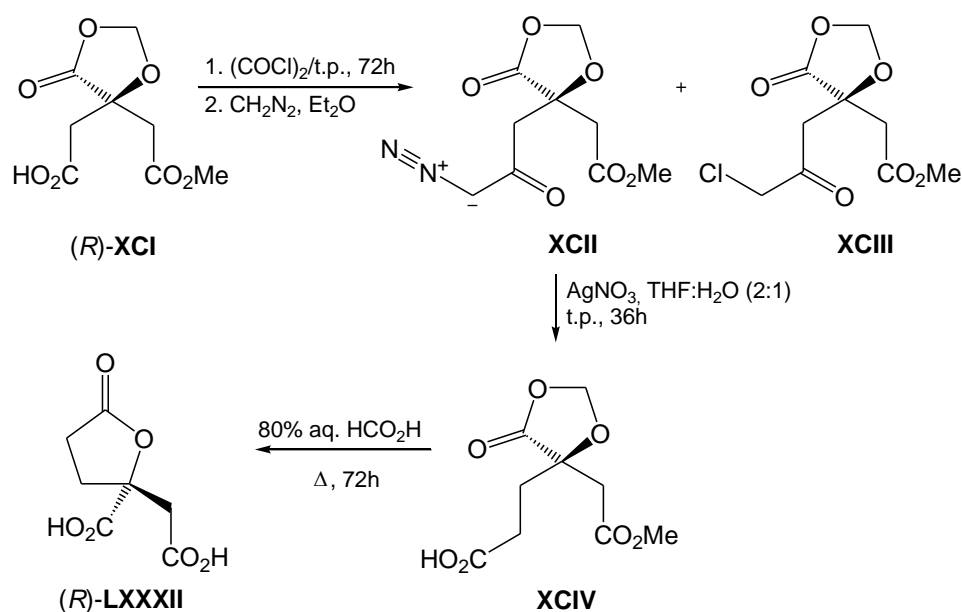
Z uwagi na niestabilność chemiczną kwasu homocytrynowego, wszystkie syntezy prowadzą głównie do powstawania jego cyklicznej postaci, czyli γ -laktonu. Stąd, coraz więcej jest publikacji na temat syntezy optycznie czynnego laktonu kwasu homocytrynowego. Jedno z ostatnich doniesień literaturowych⁵⁵ dotyczy otrzymywania γ -laktonu kwasu (*S*)-homocytrynowego z zastosowaniem metodyki SRS Seebach'a (ang. *self-regeneration of stereocenters*)⁵⁶ czyli samoodnawiania centrów stereogenicznych, a optycznie czynnym materiałem wyjściowym jest (*S*)-fenyloalanina (Rysunek 13). (*S*)-Fenyloalaninę poddaje się reakcji diazowania azotynem sodu⁵⁷ i *cis*-diastereoselektywnego tworzenia 2-*tert*-butylo-5-benzylo-1,3-dioksolanonu (*S,S*)-**LXXXV** pod działaniem aldehydu piwaloilowego.⁵⁸ Kluczowym etapem syntezy jest reakcja alkilowania enolanu (*S*)-**LXXXVI** bromkiem allilu, która prowadzi do powstawania alkilowanego dioksolanonu **LXXXVII** z wydajnością 42%. W przypadku zastosowania bardziej reaktywnego jodku allilu, wydajność reakcji wzrasta do 71%, a produkt **LXXXVII** otrzymywany jest jako jeden diastereoizomer, co potwierdzono spektroskopią ¹H NMR.



Rysunek 13. Strategia syntezy γ -laktanu kwasu (*S*)-homocytrynowego, biorąca początek z (*S*)-fenyloalaniny.

Oksydacyjne hydroborowanie ($\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$; 30% H_2O_2) dioksofanonu **LXXXVII** prowadziło do powstawania alkoholu **LXXXVIII** jako pojedynczego regioizomeru. Dalsze utlenianie, powstałego we wcześniejszym etapie, pierwszorzędowego alkoholu **LXXXVIII** skutkuje tworzeniem się kwasu karboksylowego **LXXXIX**. Natomiast wydłużenie czasu reakcji, w warunkach utleniających, powoduje odszczepianie grupy fenylovej, dzięki czemu uzyskuje się kwas dikarboksylowy **XC**. Następnie, w wyniku działania kwasem trifluorooctowym związek **XC** przekształcono w lakton kwasu (*S*)-homocytrynowego (*S*)-**LXXXII**.⁵⁹

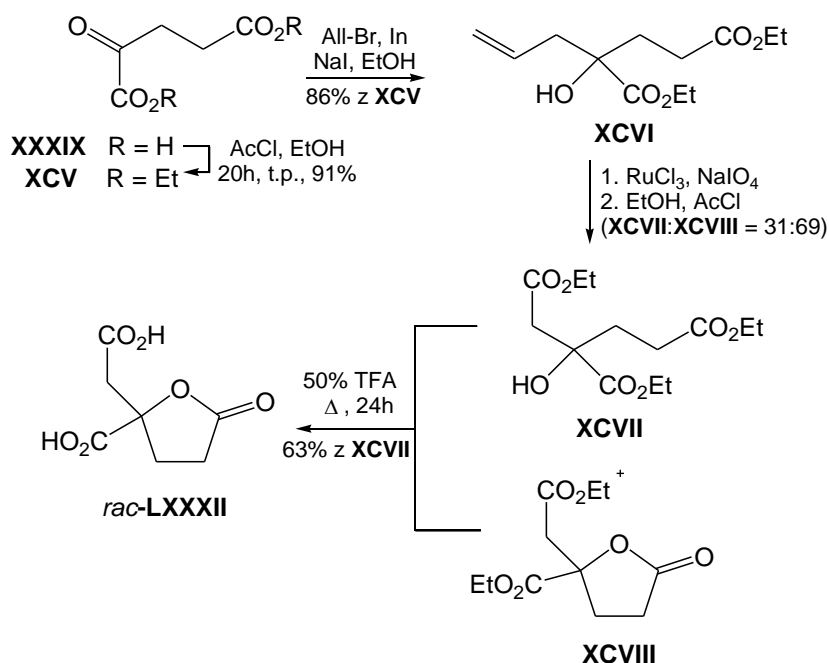
Kolejna metoda syntezy γ -laktanu kwasu (*R*)-homocytrynowego **LXXXII** opiera się na wydłużaniu łańcucha węglowego w reakcji Arndta-Eisterta (Rysunek 14).⁶⁰



Rysunek 14. Strategia syntezy γ -laktonu kwasu (*R*)-(-)-homocytrynowego z kwasu metylenocytrynowego.⁶⁰

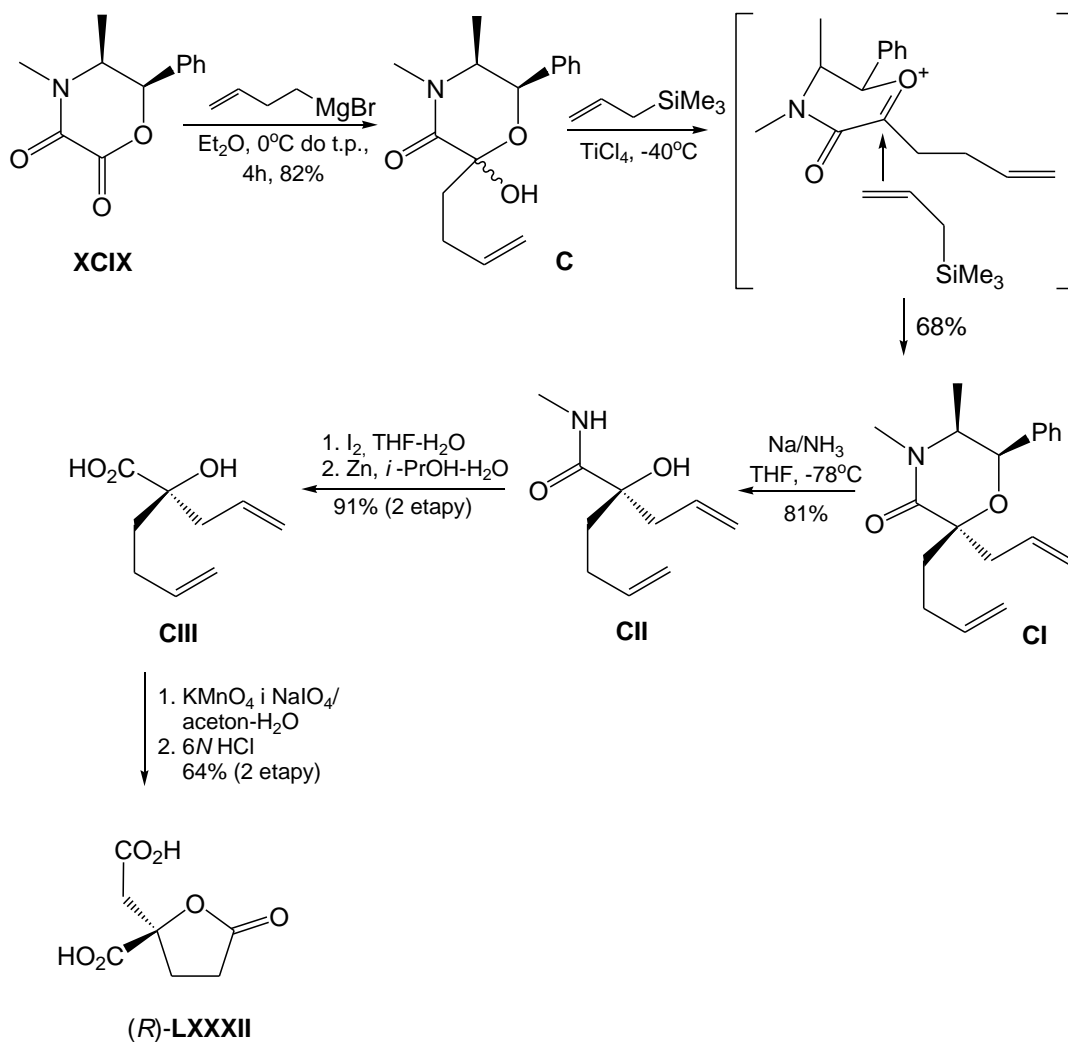
Optycznie czynny monoester kwasu metylenocytrynowego (*R*)-**XCI** traktowano chlorkiem oksalilu, a następnie diazometanem, otrzymując w ten sposób głównie diazoketon **XCII** oraz produkt uboczny α -chloroketon **XCIII** (15%). Następnie pod wpływem azotanu srebra (I) związek **XCII** przekształcano w przegrupowaniu Wolffa w monoester kwasu dikarboksylowego **XCIV**. Ostatecznie, ogrzewanie związku **XCIV** z 80% kwasem mrówkowym, prowadziło do powstania γ -laktonu kwasu (*R*)-(-)-homocytrynowego (**LXXXII**).⁶⁰

Chen i współ.⁶¹ zaproponowali syntezę racemicznego γ -laktonu kwasu homocytrynowego z handlowo dostępnego kwasu α -ketoglutarynowego (**XXXIX**). Po reakcji estryfikacji, α -ketoglutaran dietylowy **XCIV** poddawano reakcji alkilowania bromkiem allilu w obecności metalicznego indu i jodku sodu.⁶² W kolejnym etapie utleniano związek **XCVI** przy użyciu nadjodanu sodu w obecności chlorku rutenu. Następnie surowy produkt, wodorohomocytrynian dietylu, estryfikowano etanolem wobec chlorku acetylenu, co w rezultacie prowadziło do mieszaniny związków: homocytrynianu trietylu **XCVII** i diestru γ -laktonu **XCVIII** w stosunku 31:69. Tak powstałą mieszaninę estrów etylowych **XCVIII** oraz **XCVII** traktowano 50% wodnym roztworem kwasu trifluorooctowego, otrzymując γ -laktone kwasu homocytrynowego *rac*-**LXXXII** (Rysunek 15).⁶¹



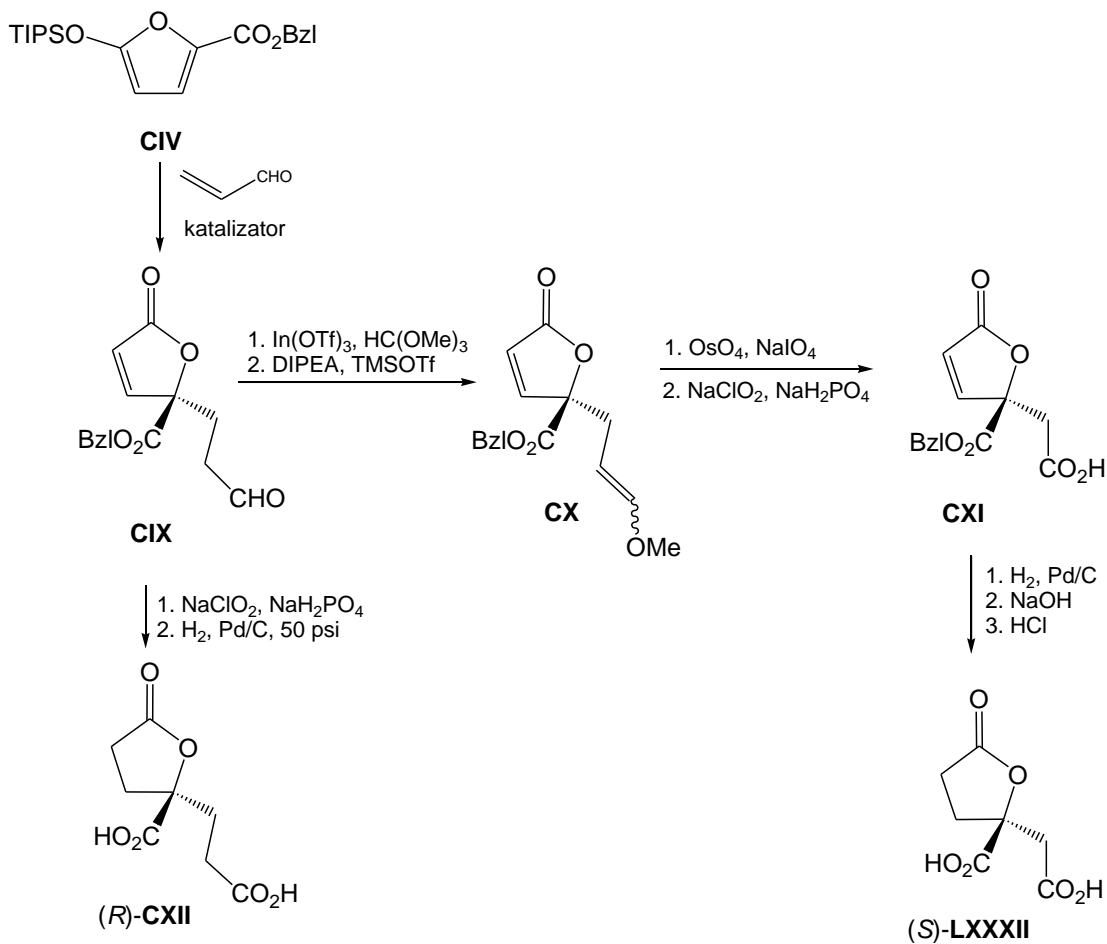
Rysunek 15. Metoda syntezy γ -laktonu racemicznego kwasu homocytrynowego, wykorzystująca jako substrat kwas α -ketoglutarynowy.

Jedną z ostatnich metod syntezy γ -laktonu kwasu (*R*)-homocytrynowego,⁶³ opiera się na podwójnym alkirowaniu chiralnej pochodnej kwasu szczawiowego – cyklicznego dionu **XCIX** (Rysunek 16). Traktowanie tego związku bromkiem 3-butenylomagnezowym prowadzi do tworzenia się hemiketalu **C**. Następnie hemiketal **C** poddano ponownej reakcji alkirowania, ale tym razem allilotrimetylosilanem. Reakcja ta przebiega z wysoką diastereoselektywnością dając dialkilomorfolinon **CI** praktycznie jako jeden diastereoizomer (*ee* 98%). W kolejnym etapie ze związku **CI** usunięto część efedrynową w reakcji z sodem metalicznym w amoniaku w temperaturze -78°C . Uzyskano w ten sposób amid kwasu hydroksykarboksylowego **CII**, który potraktowano jodem. Surowy produkt tej reakcji poddano procesowi dehalogenowania cynkiem, izolując hydroksykwas **CIII**. Ostatni etap syntezy polegał na reakcji utleniania terminalnych grup alkenylowych związku **CIII** mieszaniną KMnO_4 oraz NaIO_4 . Ostatecznie izolowano z mieszaniny reakcyjnej γ -lakton kwasu (*R*)-homocytrynowego (*R*)-**LXXXII** (Rysunek 16).

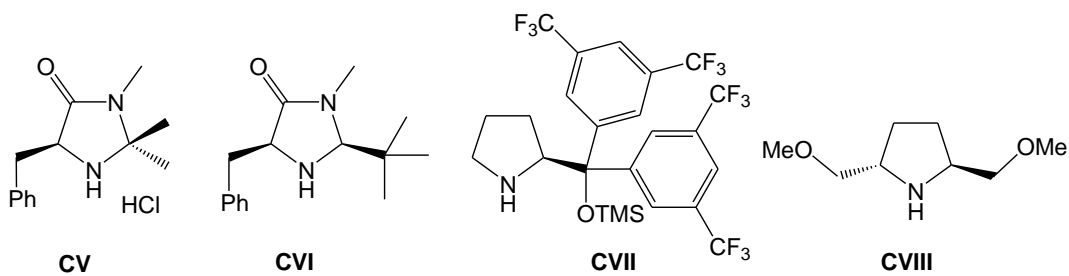


Rysunek 16. Metoda otrzymywania γ -laktonu kwasu (*R*)-homocytrynowego z morfolin-2,3-dionu.

Najnowsza metoda syntezy γ -laktonu kwasu (*R*)-homocytrynowego z 2010 roku została zaproponowana przez Pansare i in.⁶⁴ Opiera się na reakcji Mukaiyama-Michaela⁶⁵ i polega na kondensacji pochodnej furanu **CIV** z akroleiną w obecności aminowych katalizatorów pierwszej generacji MacMillana **CV-CVIII** (Rysunek 17). Powstający w ten sposób aldehyd **CIX** traktowano najpierw ortomrówczanem trimetylu, a następnie zasadą Huniga (*N,N*-diizopropyletyloaminą). W konsekwencji uzyskano związek **CX** jako mieszaninę stereoizomerów w stosunku *E* : *Z* = 2 : 1.



Rysunek 17. Metoda syntezy laktonu kwasu (*S*)-homocytrynowego i laktonu kwasu (*R*)-per-homocytrynowego.



Stosowane katalizatory pierwszej generacji MacMillana

Mieszaninę stereoizomerów **CX** przekształcono w kwas **CXI** w wyniku oksydacyjnego rozszczepienia tetraatlenkiem osmu i nadjodanem sodu. Lakton kwasu (*S*)-homocytrynowego (**(S)-LXXXII**) otrzymano poprzez hydrogenolizę pochodnej **CXI**. Ponadto zauważono, że proces utleniania aldehydu **CIX** chlorynem sodu oraz przyłączenie wodoru do podwójnego wiązania w pierścieniu powstałego kwasu prowadzi do homologu laktonu kwasu homocytrynowego, a mianowicie laktonu kwasu (*R*)-per-homocytrynowego (**(R)-CXII**) (Rysunek 17).

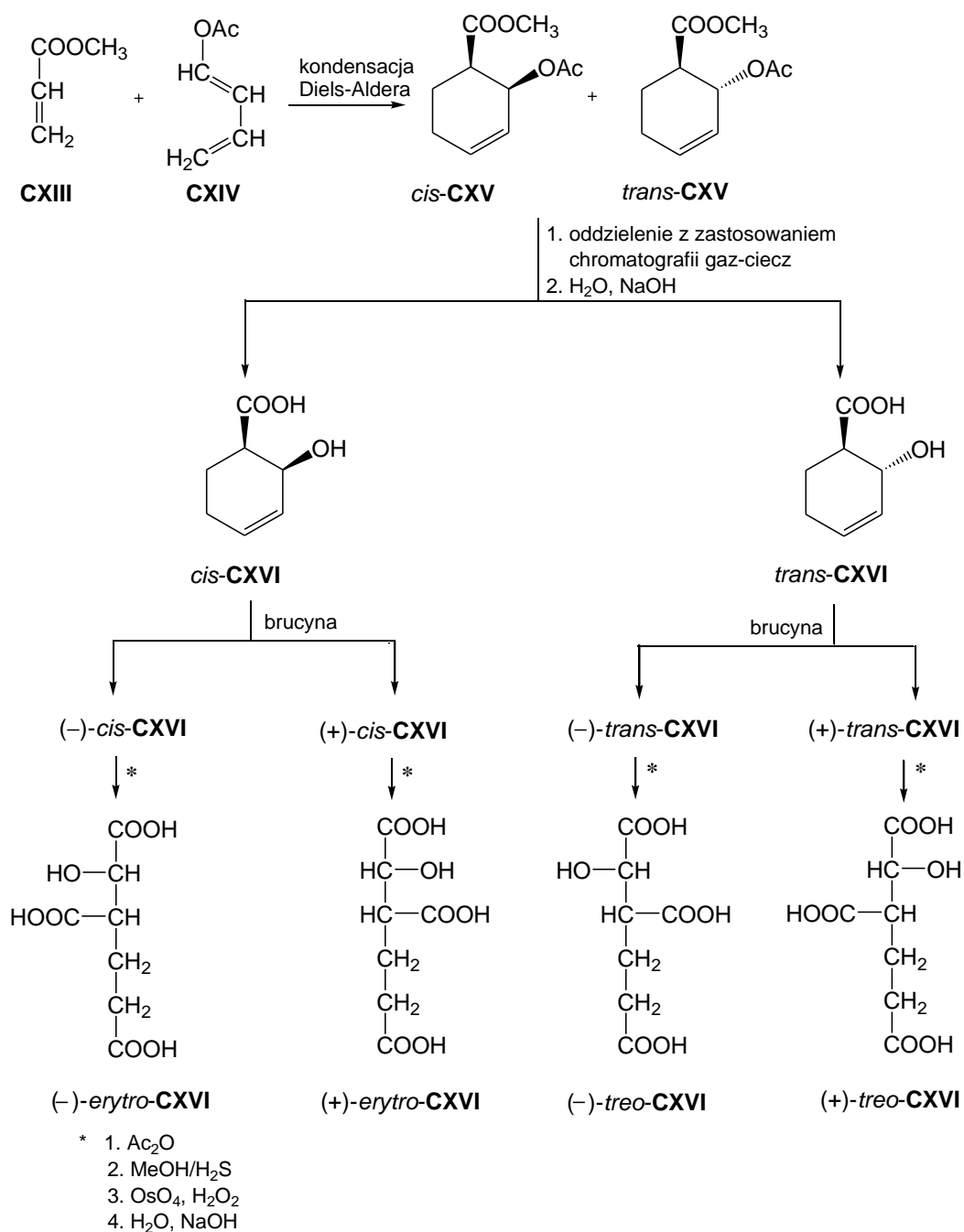
1.4.2. Kwas homoizocytrynowy

Kwas homoizocytrynowy (kwas 1-hydrokso-1,2,4-butanotrikarboksylowy) jest kolejnym, obok kwasu homocytrynowego, naturalnym intermediatem szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego biosyntezy *L*-lizyny, występującego u drożdży i niektórych grzybów. Związek ten jest wytwarzany w organizmach żywych na drodze enzymatycznej z kwasu *cis*-homoakonitowego. Enzym biorący udział w tej reakcji to homoakonitaza EC 4.2.1.36.⁵⁰

W pierwszym etapie szlaku biosyntezy kwasu *L*- α -aminoadypinowego, następuje kondensacja α -ketoglutaranu i acetyloCoA prowadząca do kwasu homocytrynowego (XXXVI), który jest przekształcany, przy udziale homoakonitazy, w kwas *cis*-homoakonitynowy (XXXVII), a następnie – w homoizocytrynowy (XXXVIII) (Rysunek 4, str.24).

Po raz pierwszy racemiczny kwas homoizocytrynowy otrzymano w wyniku kondensacji glutaranu dietylu ze szczawianem dietylu, prowadzącej do 2-szczawio-glutaranu trietylu, który następnie zredukowano do odpowiedniego hydroksyestru i przekształcono w wolny kwas.⁶⁶

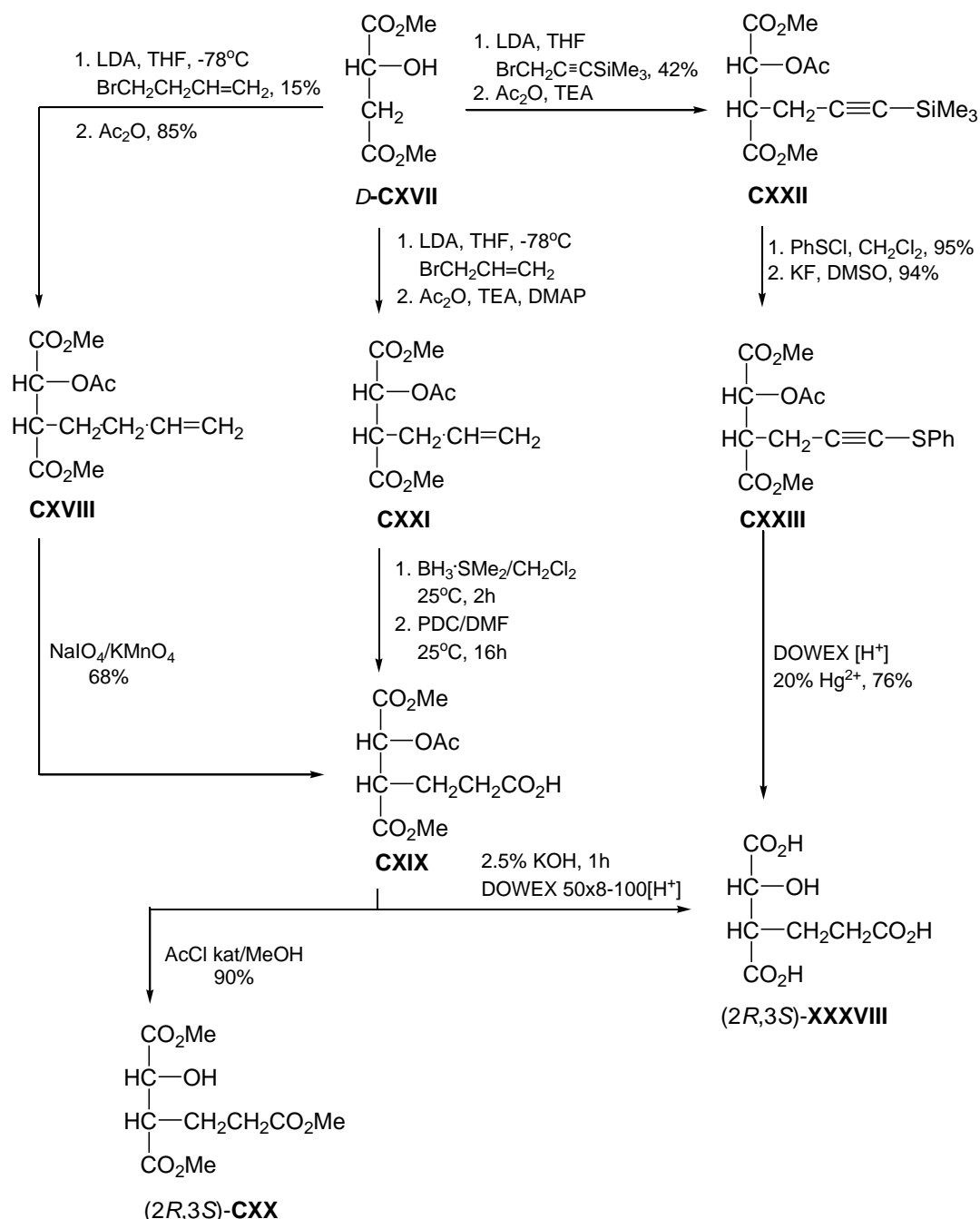
W latach 60-tych ubiegłego stulecia, Chilina i współ.⁶⁷, zsyntetyzowali i ustalili konfigurację absolutną czterech izomerów kwasu homoizocytrynowego. Synteza wykorzystuje reakcję kondensacji Dielsa-Aldera akrylanu metylu (CXIII) z 1-acetoksy-1,3-butadienem (CXIV), która prowadzi do mieszaniny estrów metylowych kwasów *cis*- i *trans*-2-acetoksy-3-cykloheksenokarboksylowych (CXV). Izomery rozdzielono przy zastosowaniu chromatografii gaz-ciecz, a następnie każdy został przekształcony w wolny kwas karboksylowy, odpowiednio *cis*- i *trans*-(CXVI). Związki te, posiadają w swojej strukturze wolną grupę karboksylową, którą wykorzystano do tworzenia diastereoizomerycznych soli z brucyną i rozdzielania ich na optycznie czynne enancjomery. Następnie wolne grupy hydroksylową i karboksylową w otrzymanych optycznie czynnych kwasach, (+)- i (-)-*cis*- oraz (+)- i (-)-*trans*-2-hydrokso-3-cykloheksenokarboksylowych (CXVI), przekształcono w odpowiednie estry. Estry metylowe kwasów *cis*- i *trans*-2-acetoksy-3-cykloheksenokarboksylowych poddano reakcji utleniania tetratlenkiem osmu, a następnie produkty traktowano 30% roztworem nadtlenu wodoru. Po hydrolizie otrzymano cztery stereoizomery kwasu homoizocytrynowego (XXXVIII). Schemat tej wieloetapowej syntezy pokazano na rysunku 18.



Rysunek 18. Synteza i rozdział optycznie czynnych izomerów kwasu homoizocytrynowego.

Schmitz i współ.⁶⁸ zaproponowali diastereoselektywną syntezę kwasu homoizocytrynowego, w której substratami były *D*-jabłczan dimetylu (**CXVII**) i 4-bromo-1-buten. Produkt **CXVIII** reakcji alkilowania uzyskano z wydajnością 15% (*treo* : *erythro* = 80 : 20). W wyniku dalszych reakcji: acetylowania grupy hydroksylowej bezwodnikiem octowym, utlenienia wiązania podwójnego nadjodaniem sodu i nadmanganianem potasu, a następnie usunięcia grupy acetylowej, z jednoczesną

estryfikacją wolnej grupy karboksylowej, otrzymano triester metylowy kwasu homoizocytrynowego **CXX** (Rysunek 19).



Rysunek 19. Synteza kwasu (2R,3S)-homoizocytrynowego **XXXVIII** i jego triestru metylowego **CXX**.

Dalsze prace nad kwasem homoizocytrynowym prowadzone przez ten zespół, przyniosły kolejną, efektywniejszą metodę jego syntezy.⁶⁹ W reakcji alkilowania dianionu *D*-jabłczanu dimetylu (**CXVII**) bromkiem (trimetylosililo)propargilu uzyskano 3-[(trimetylosililo)propynylo]jabłczan dimetylu. Po acetylowaniu grupy hydroksylowej, powstałe dwa diastereoizomery rozdzielono przy użyciu chromatografii kolumnowej –

izolowano nadmiar diastereoizomeru (2*R*,3*S*)-**CXXII**. W kolejnym etapie związek **CXXII** potraktowano chlorkiem benzenosulfenylowym, co w rezultacie dawało produkt addycji z wysoką wydajnością 95%. Następnie reakcja β -eliminacji chlorku trimetylosililu w obecności fluorku potasu w DMSO doprowadziła do powstania tioeteru **CXXIII**. Ostatni etap syntezy polegał na rozszczepieniu tioeteru **CXXIII** przy pomocy siarczanu rtęci(II) w środowisku wodnym w obecności złoza jonowymiennego DOWEX 50x8. Niestety produkt – kwas homoizocytrynowy (2*R*,3*S*)-**XXXVIII** izolowano w postaci oleju (Rysunek 19).

Ma i Palmer⁵¹ do syntezy kwasu homoizocytrynowego również zastosowali metodę zaproponowaną przez Schmitz i współ.,^{68,69} jednak do reakcji alkilowania *D*-jabłczanu metylu **CXVII** użyli bromku allilu. Tłumaczyli to faktem, że bromek allilu jest 50-krotnie tańszy w porównaniu z bromkiem (trimetylosililo)propargilu, poza tym reaguje z dianionem *D*-jabłczanu dimetylu z lepszą diastereoselektywnością (19:1) i wydajnością 80%, wbrew temu co donosili Schmitz i współ.^{68,69} Następnie *D*-3-allilojabłczan dimetylu był poddawany reakcji acetylowania bezwodnikiem octowym. Alken **CXXI** hydroborowano, a następnie I-rzędowy alkohol utleniano dichromianem pirydyny do związku **CXIX**. Po reakcji hydrolizy izolowano kwas (2*R*,3*S*)-homoizocytrynowy **XXXVIII** (Rysunek 19).

2. CEL I ZAKRES PRACY

Celem niniejszej pracy było zaprojektowanie struktur, opracowanie metod syntezy i otrzymanie szeregu nowych związków – potencjalnych inhibitorów enzymów szlaku biosyntezy *L*-lizyny.

Zakres badań, które należało wykonać dla realizacji celu pracy obejmował:

- otrzymanie wybraną metodą optycznie czynnego kwasu homocytrynowego i homoizocytrynowego, które będą stanowiły istotne substraty wyjściowe do syntezy zaprojektowanych związków, o charakterze potencjalnych inhibitorów enzymów szlaku biosyntezy kwasu *L*- α -aminoadypinowego;
- optymalizację warunków wybranej metody syntezy optycznie czynnego kwasu homocytrynowego oraz homoizocytrynowego;
- zaprojektowanie strategii otrzymywania fluorowanych pochodnych kwasu cytrynowego i homoizocytrynowego oraz opracowaniu warunków wprowadzania atomu fluoru do cząsteczki związku;
- syntezę nienasyconych analogów kwasu homocytrynowego czyli *cis*- i *trans*-homoakonitynianu trimetylu, pochodnej fluorowej kwasu cytrynowego: 3-fluorodehydroksycytrynianu trimetylu oraz kwasów dikarboksyłowych, w tym związków fluorowanych o charakterze potencjalnych inhibitorów dehydrogenazy homoizocytrynianu;
- otrzymanie difluorometylolizyny (DFML) - homologu znanego inhibitora enzymatycznego difluorometyloornityny (DFMO);

Uzyskane związki zostały wykorzystane do badań biologicznych w celu wyznaczenia ich aktywności przeciwgrzybowej oraz zdolności inhibicyjnej w stosunku do enzymów szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego w szlaku biosyntezy lizyny.

3. OMÓWIENIE UZYSKANYCH WYNIKÓW

3.1. Założenia racjonalnego projektowania i syntezy potencjalnych inhibitorów enzymów szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego.

Przystępując do realizacji projektu badawczego, którego głównym celem miało być zaprojektowanie struktur i otrzymanie potencjalnych inhibitorów enzymów szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego, przyjąłm założenia oparte na gruntownej analizie dotychczasowego stanu wiedzy dotyczącej struktur centrów aktywnych, spektrum substratowego i mechanizmów katalizy enzymów katalizujących reakcje szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego, na analogiach do struktur znanych inhibitorów enzymów katalizujących inne reakcje metaboliczne, podobne do reakcji szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego oraz na ogólnych zasadach konstrukcji potencjalnych inhibitorów enzymatycznych. Uznałam, że szczególnie interesujące, jako potencjalne cele molekularne, mogą być enzymy katalizujące trzy pierwsze reakcje szlaku, czyli syntaza homocytrynianowa (HCS), homoakonitaza (HA) i dehydrogenaza homoizocytrynianowa (HD), gdyż są to enzymy wyjątkowe dla grzybów, nie mające swoich odpowiedników w komórkach ssaczyh. Przy projektowaniu struktur potencjalnych inhibitorów HCS, HA i HD mogłam wykorzystać dane literaturowe dotyczące znanych inhibitorów syntazy cytrynianowej, akonitazy i dehydrogenazy izocytrynianowej – enzymów cyklu Krebsa, wykazujących bliską analogię do HCS, HA i HD, szczególnie pod względem identyczności mechanizmów katalizowanych reakcji. Zaplanowane przeze mnie potencjalne inhibitory miały być analogami strukturalnymi substratów, produktów lub hipotetycznych stanów albo produktów przejściowych reakcji, katalizowanych przez trzy pierwsze enzymy szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego. Zakładałam także możliwość wprowadzenia do planowanych struktur ugrupowań reaktywnych, takich jak grupa epoksydowa lub grupa difluorometylowa. Opierając się na sformułowanych powyżej założeniach ogólnych, przyjąłm następujące założenia szczegółowe dotyczące projektowania i syntezy potencjalnych inhibitorów HCS, HA i HD.

3.1.1. Potencjalne inhibitory syntazy homocytrynianowej.

Uznałam za bezcelowe próby wykorzystania analogów strukturalnych substratów tego enzymu jako potencjalnych inhibitorów. Substratami HCS są: acetylo-CoA i kwas

α -ketoglutarynowy. Oba te związki są powszechnie występującymi w przyrodzie metabolitami, tak więc ich analogi strukturalne mogłyby hamować aktywność wielu enzymów, w tym także wielu enzymów ssaczych, co wyklucza możliwość ich selektywnego działania przeciwgrzybowego. Założyłam natomiast, że selektywnymi inhibitorami syntazy homocytrynianowej mogłyby być związki o strukturze analogów produktu, czyli kwasu *R*-homocytrynowego oraz analogi inhibitora fizjologicznego, jakim jest *L*-lizyna. W tym drugim przypadku, za celową uznałam syntezę pochodnej lizyny zawierającej ugrupowanie α -difluorometylowe, dzięki któremu związek ten mógłby potencjalnie łączyć się kowalencyjnie z resztą lub resztami aminokwasowymi obecnymi w centrum wiązania *L*-lizyny w HCS.

3.1.2. Potencjalne inhibitory homoakoniazy

W przypadku tego enzymu potencjalnymi inhibitorami o możliwym selektywnym działaniu przeciwgrzybowym mogą być analogi substratu, czyli kwasu *R*-homocytrynowego, produktu - kwasu *2R,3S*-homoizocytrynowego, a także produktu przejściowego, jakim jest kwas *cis*-homoakonitynowy. Biorąc pod uwagę, że znanym inhibitorem homologicznej akoniazy jest 2-fluorohomocytrynian,⁷⁰ założyłam celowość konstrukcji i syntezy fluoropochodnych kwasu homocytrynowego, kwasu *cis*-homoakonitynowego i kwasu homoizocytrynowego. Uznałam ponadto, że inhibitorami HA mogłyby być analogi kwasu *cis*-homoakonitynowego zawierające reaktywne ugrupowanie epoksydowe, wygenerowane w wyniku utlenienia wiązania podwójnego.

3.1.3. Potencjalne inhibitory dehydrogenazy homoizocytrynianowej

Selektywnymi inhibitorami tego enzymu mogłyby być analogi substratu, czyli kwasu (*2R,3S*)-homoizocytrynowego, produktu – kwasu α -ketoaldyminowego oraz stanu przejściowego o nieznaną strukturę. Założyłam w tym przypadku możliwość sprawdzenia aktywności inhibicyjnej analogów kwasu homoizocytrynowego zaprojektowanych jako analogi produktu reakcji katalizowanej przez homoakoniazę. Ponadto zamierzałam zaprojektować analogi substratu/stanu przejściowego, zawierające w strukturze fragment o charakterze hydrofobowym – podobny do inhibitorów HD opisanych w literaturze.^{47,48}

3.2. Opracowanie metod syntezy kwasów homocytrynowego i homoizocytrynowego

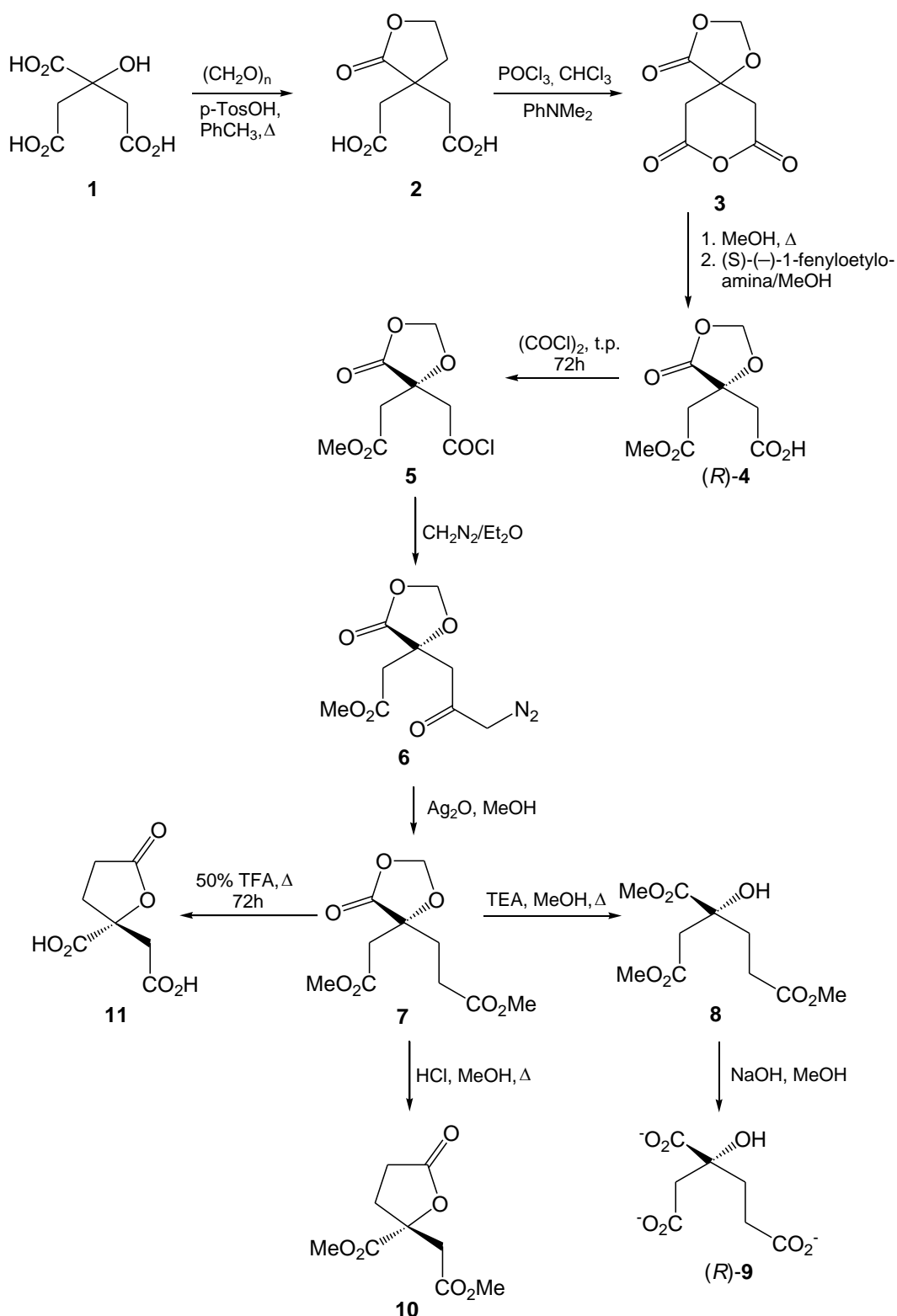
Większość planowanych, potencjalnych inhibitorów jest strukturalnymi analogami kwasów homocytrynowego i homoizocytrynowego. Punktem wyjścia do opracowania metod syntezy tych związków była możliwość efektywnej syntezy struktur wyjściowych czyli kwasów homocytrynowego i homoizocytrynowego.

3.2.1. Synteza kwasu homocytrynowego

Kwas homocytrynowy jest ważną substancją o znaczeniu biologicznym, ale w mojej pracy, przede wszystkim był on istotnym związkiem wyjściowym do syntezy *cis*- i *trans*-homoakonitynianu trimetylu oraz ich epoksydowych pochodnych. Ponadto był niezbędny do przeprowadzenia badań biochemicznych jako substrat dla homoakonitazy. Kwas ten nie jest syntezowany u ssaków, dlatego enzym katalizujący jego biosyntezę, czyli syntaza homocytrynianowa, może być postrzegany jako potencjalny cel molekularny w chemoterapii przeciwgrzybowej.^{46,47,71} Zarówno, kwas homocytrynowy, jak i jego γ -lakton niestety nie są dostępne komercyjnie. Do badań biologicznych postanowiłam otrzymać kwas homocytrynowy w postaci optycznie czynnej.

Ze względu na wysoką niestabilność chemiczną kwasu homocytrynowego, wszystkie próby otrzymywania tego związku w postaci wolnej, kończą się izolowaniem jego trwalszej postaci, a mianowicie γ -laktonu kwasu homocytrynowego, co zostało szerzej omówione w części teoretycznej. Niektóre strategie prowadzą do syntezy triestru kwasu homocytrynowego^{52,61} lub jego soli trisodowej.⁵¹

Z wielu omówionych metod syntezy optycznie czynnego kwasu homocytrynowego zdecydowałam się na tę, wykorzystującą jako substrat kwas cytrynowy (**1**). Chemia kwasu cytrynowego jest w dużym stopniu znana, a reakcje, którym ten związek ulega wydają się być prostymi. Większość etapów zmodyfikowałam w stosunku do opisanych w literaturze. Stąd, cała synteza stanowi alternatywną metodę otrzymywania optycznie czynnego homocytrynianu trisodowego. Schemat proponowanej przeze mnie wieloetapowej syntezy przedstawiam na Rysunku 20.



Rysunek 20. Schemat wieloetapowej syntezy homocytrynianu trisodowego (-)-9.

W pierwszej kolejności otrzymałam optycznie czynny monoester metylowy kwasu metylenocytrynowego **4**, który był istotnym substratem w reakcji wydłużania łańcucha węglowego o jedną grupę metylenową. W kwasie metylenocytrynowym **2**

równocześnie są chronione dwie grupy funkcyjne: hydroksylowa oraz centralna karboksylowa kwasu cytrynowego, a jego monopochodne są optycznie czynne. Ponadto w monoestrze kwasu metylenocytrynowego **4** jest nadal obecna wolna grupa karboksylowa, którą można wykorzystać do tworzenia diastereoizomerycznych soli z optycznie czynnymi zasadami w czasie rozdzielania go na optycznie czynne antypody. Dlatego kwas cytrynowy przekształciłam w kwas metylenocytrynowy **2** poprzez ogrzewanie z paraformaldehydem, w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego w chloroformie. Jest to nowa metoda syntezy kwasu metylenocytrynowego opracowana w oparciu o literaturę.⁷² Surowy produkt oczyściłam poprzez krystalizację z wody, otrzymując kremowy, krystaliczny związek z wydajnością 55%.

Następnie, działając tlenochlorkiem fosforu na zawiesinę kwasu metylenocytrynowego w obecności *N,N*-dimetyloaniliny, uzyskałam bezwodnik kwasu metylenocytrynowego (**3**) w postaci białych, opalizujących kryształów. Kolejnym etapem syntezy było utworzenie wodorometylenocytrynianu metylu (**4**). Zrealizowałam to poprzez ogrzewanie bezwodnika **3** w bezwodnym metanolu. Wodorometylenocytrynian metylu (**4**) rozdzieliłam na enancjomery, tworząc diastereizomeryczne sole z (*S*)-(-)- lub (*R*)-(+)-1-fenyletyloaminą. W przeciwieństwie do lit.⁷³ do krystalizacji diastereoizomerycznych soli, zaproponowałam metanol. Takie postępowanie wykluczało powstawanie estru etylowego w wyniku reakcji transestryfikacji podczas procesu krystalizacji. Ponadto zmiana rozpuszczalnika z alkoholu etylowego na metylowy skutkowała lepszym efektem separacji (otrzymywałam wodorometylenocytrynian metylu o wyższej skręcalności).

Kolejnym, ważnym etapem syntezy, przed wydłużeniem łańcucha węglowego, było aktywowanie wolnej grupy karboksylowej optycznie czynnego monoestru metylowego kwasu metylenocytrynowego **4**. W literaturze opisane są metody otrzymywania diazoketonów poprzez chlorki kwasowe⁷⁴ lub rzadziej, mieszane bezwodniki.⁷⁵ Ponieważ druga z tych aktywacji wymaga mniej drastycznych warunków prowadzenia reakcji zdecydowałam się przebadać możliwości jej zastosowania w przypadku metylenocytrynianu metylu. Podjęłam próby otrzymania diazoketonu z zastosowaniem chloromrówczanu izobutyli i *N*-metylomorfoliny lub trietyloaminy. Następnie mieszany bezwodnik traktowałam diazometanem. Reakcje te nie dawały jednak zadowalających rezultatów. Diazoketon otrzymywałam z bardzo niskimi wydajnościami, odpowiednio 31% i 11% (Część eksperymentalna, podrozdział 4.2.6). Zdecydowałam się zatem na 'klasyczny' wariant, czyli działanie diazometanem na

chlorek kwasowy, który otrzymałam w reakcji wodorometylenocytrynianu metylu **4** z chlorkiem oksalilu lub tionylu. W drugim przypadku reakcja przebiegała bardzo szybko (1h) po ogrzaniu substratu z chlorkiem. Produkt **5** izolowałam w formie bezbarwnego oleju, który bez dodatkowego oczyszczania zadawałam eterowym roztworem diazometanu. W takich warunkach obserwowałam powstawanie diazoketonu z dobrą wydajnością (Część eksperymentalna, podrozdział 4.2.6).

W reakcji chlorków kwasowych z diazometanem najczęściej powstają dwa produkty: diazoketon oraz chloroketon.⁶⁰ Aby uniknąć powstawania większych ilości produktu ubocznego - chloroketonu, diazometan dodawałam w nadmiarze. Przebieg reakcji śledziłam przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Otrzymałam diazoketon jako gęsty, żółty olej, który oczyszczałam za pomocą flash chromatografii na żelu krzemionkowym. Ze względu na dużą labilność chemiczną diazoketonu, bezpośrednio po otrzymaniu i spektroskopowym potwierdzeniu struktury, przekształciłam go w metylenohomocytrynian dimetylu (**7**), w reakcji wydłużenia łańcucha węglowego metodą Arndta-Eisterta.^{76,77} Stwierdziłam, że przegrupowanie Wolffa zachodzi z lepszymi wydajnościami i bardziej jednoznacznie w obecności tlenku srebra aniżeli z innymi solami srebra I (np. AgNO₃). Ponadto zastosowałam jako drugi reagent metanol, a nie wodę, co skutkowało powstawaniem diestru, a nie monoestru kwasu metylenohomocytrynowego. Z uwagi na tlenek srebra I, mieszaninę reakcyjną zostawiałam w zamkniętej kolbie bez dostępu światła w temperaturze pokojowej, a przebieg procesu obserwowałam z użyciem techniki TLC w układzie B. Surowy produkt oczyszczałam poprzez flash chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym, gdzie eluentem był octan etylu. Otrzymałam żółty olej o skręcalności $[\alpha]_D -3,7$ (c4,1; MeOH). Strukturę tego związku potwierdziłam m. in. spektroskopią ¹H i ¹³C NMR oraz widmem spektroskopii masowej (MS). W widmach stwierdziłam obecność sygnałów rezonansowych charakterystycznych odpowiednio dla protonów i atomów węgla omawianego związku **7** (Część eksperymentalna, podrozdział 4.2.7).

Ostatni etap syntezy polegał na reakcji otwierania pierścienia dioksolanowego diestru metylowego kwasu metylenohomocytrynowego (**7**) do triestru metylowego kwasu homocytrynowego (**8**). Zbadałam przebieg takiego procesu, zarówno w warunkach katalizy zasadowej, jak i kwasowej. Istotnym problemem jest labilność chemiczna kwasu homocytrynowego oraz jego pochodnych, które cyklizują do pochodnej γ -laktanu. Otwieranie pierścienia dioksolanowego w środowisku kwasowym

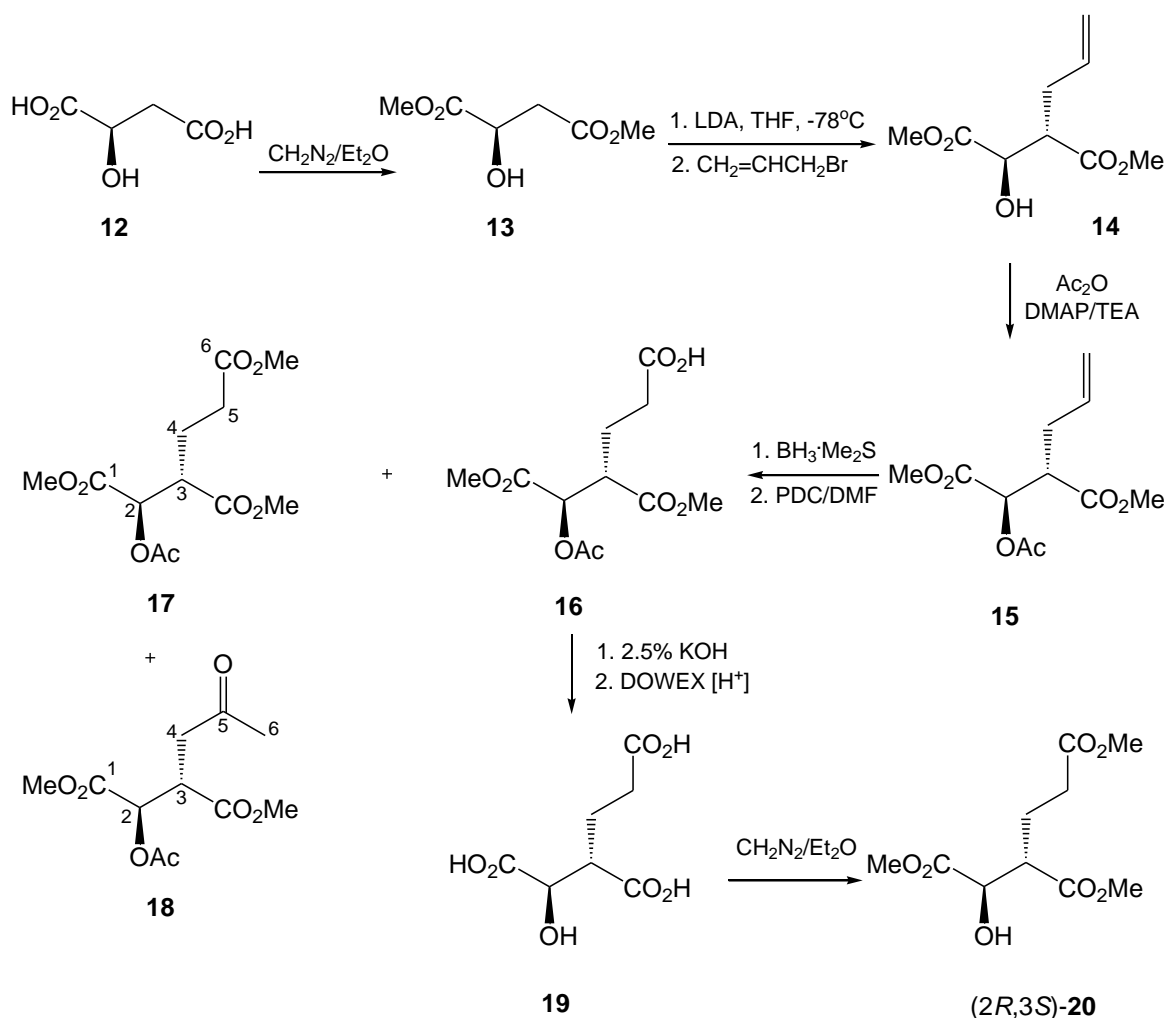
prowadziło głównie do izolacji γ -laktonu kwasu homocytrynowego. Natomiast ogrzewanie diestru metylowego kwasu metylenohomoctrynowego z równomolową ilością trietyloaminy w metanolu powodowało powstawanie homocytrynianu trimetylu (**8**). Ze względu na nietrwałość chemiczną triestru przy otrzymywaniu należy unikać dłuższego przechowywania tego związku. Hydroliza alkaliczna triestru **8**, 1M roztworem wodorotlenku sodu w metanolu, dawała homocytrynian trisodowy (**9**). W rezultacie zsyntezowałam optycznie czynny kwas homocytrynowy w postaci soli trisodowej **9** o skręcalności $[\alpha]_D -4,8$ (c 1,7; H₂O) z wydajnością 96%. Strukturę związku potwierdziłam widmem spektroskopii masowej, w którym obserwowałam jon molekularny m/z 273,05 [M+1]; obl. dla C₇H₇O₇Na₃ 272,09 (MS) oraz protonowym i węglowym magnetycznym rezonansem.

Ponadto hydroliza diestru **7** poprzez ogrzewanie go z 50% wodnym roztworem kwasu trifluorooctowego, a następnie krystalizację z octanu etylu, tak otrzymanego surowego produktu, prowadziła do powstania optycznie czynnego γ -laktonu kwasu homocytrynowego (**11**), w postaci bezbarwnych kryształów (Rysunek 20). Strukturę laktonu potwierdziłam spektroskopią NMR.

3.2.2. Synteza kwasu homoizocytrynowego

Kwas homoizocytrynowy jest naturalnym produktem jednego z etapów szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego biosyntezy *L*-lizyny w organizmach grzybowych.⁴⁶ Związek ten również nie jest dostępny handlowo. W przypadku mojej pracy jest on niezbędny do przeprowadzenia badań biochemicznych z enzymem dehydrogenazą homoizocytrynianową, jako istotny związek przejściowy szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego. Co więcej będzie stanowił w pracach biologicznych ważny związek porównawczy z jego pochodnymi: kwasami dialkylkarboksylowymi oraz jego pochodną fluorową - (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-metoksykarbonylowodoroadypinianem 1-metylu.

Syntezę kwasu homoizocytrynowego przeprowadziłam w oparciu o metodę zaproponowaną przez Ma i Pamera.⁵¹ Schemat syntezy przedstawiam na Rysunku 21.



Rysunek 21. Strategia syntezy kwasu (2*R*,3*S*)-homoizocytrynowego i jego estru metylowego **20**.

Powyższa synteza składała się z kilku etapów i wymagała praktycznie opracowania warunków dla każdego etapu, które przebiegały często z różnymi problemami, o których autorzy nie wspominali. Substratem wyjściowym w syntezie jest kwas *D*-jabłkowy (**12**), który przeprowadziłam w jego ester – *D*-jabłczan dimetylu (**13**) w reakcji z diazometanem. Związek **13** zawiera ugrupowanie metylenowe, z dwoma ‘kwaśnymi’ protonami w sąsiedztwie grupy metoksykarbonylowej. Stwarza to możliwość oderwania jednego z α-protonu przez silną zasadę i przyłączenie reszty allylowej do tak powstałego karboanionu. Podobnie jak w literaturze,⁵¹ jako zasady użyłam *N,N*-diizopropylamidku litu, przygotowanego bezpośrednio przed reakcją, z *n*-butylolitu i diizopropylaminy. Natomiast odczynnikiem alkilującym był bromek allylu. Praca z butylolitem, ze względu na jego właściwości fizykochemiczne (wysoka łatwopalność i gwałtowna reakcja z wodą) wymaga od eksperymentatora zachowania szczególnej ostrożności i bezpieczeństwa podczas jego stosowania. Wszystkie

odczynniki, w tym rozpuszczalniki musiały być bezwodne, a szkło do prowadzenia reakcji wysuszone i odpowiednio zabezpieczone przed wilgocią. Reakcję alkilowania *D*-jabłczanu dimetylu prowadziłam w atmosferze gazu obojętnego – argonu. Otrzymałam 3-allilobjabłczan dimetylu (**14**), który oczyszczałam za pomocą flash chromatografii na żelu krzemionkowym. W wyniku uzyskałam produkt **14** w postaci żółtego oleju z diastereoselektywnością 8 : 1. Ma i Palmer⁵¹ otrzymywali natomiast ten sam produkt z diastereoselektywnością 19 : 1. Być może wpływ na to miała czystość optyczna wyjściowego związku i rodzaj stosowanych odczynników. Niestety podczas reakcji alkilowania obserwowałam powstawanie dodatkowego produktu, który zidentyfikowałam jako 3-*n*-butylojabłczan dimetylu, autorzy natomiast nie wspominają o tym produkcie ubocznym. Prostim wytłumaczeniem tego faktu jest alkilowanie enolanu jonem *n*-butylovym pochodzącym z *n*-butylolitu. Praca ze związkami, które w swojej budowie zawierają ugrupowanie allilowe jest utrudniona z uwagi na znaczną lotność takich substancji. Szczególnie trudne było oczyszczanie ich na kolumnie, gdzie dużo związku traciłam podczas usuwania rozpuszczalników pod zmniejszonym ciśnieniem. Czynność tę musiałam wykonywać na ‘zimnej’ łaźni, a i to również wiązało się z częściową utratą związku. Stąd wydajność reakcji wynosiła tylko 62%. Kolejnym krokiem w syntezie kwasu homoizocytrynowego jest utlenienie wiązania podwójnego ugrupowania allilowego w celu otrzymania łańcucha bocznego z wolną grupą karboksylową. Pochodna allilowa **14** posiada w swojej strukturze grupę hydroksylową, która również może ulegać reakcji utlenienia. Aby temu zapobiec, grupę hydroksylową związku **14** poddałam reakcji acetylowania bezwodnikiem octowym, w wyniku czego uzyskałam 2-acetoksy-3-allilobursztynian dimetylu (**15**). Ze względu na lotność substratu allilowego, postanowiłam przeprowadzić reakcję acetylowania bezpośrednio po alkilowaniu bez oczyszczania związku **14**.

Dalsza synteza polegała na procesie hydroborowania wiązania podwójnego i utlenieniu tak otrzymanej pierwszorzędowej grupy hydroksylowej do karboksylowej w reakcji z dichromianem pirydyny w bezwodnym dimetyloformamidzie. W rezultacie powstawała mieszanina związków, którą rozdzielałam za pomocą flash chromatografii na żelu krzemionkowym. Głównym składnikiem mieszaniny poreakcyjnej był 2-acetoksy-3-metoksykarbonylowodoroadypinian 1-metylu (**16**). W wyniku utleniania powstawało wiele produktów ubocznych, z których udało mi się wyizolować i zidentyfikować m.in. 2-acetoksy-3-metoksykarbonyloadypinian dimetylu (**17**) oraz 2-acetoksy-3-metoksykarbonylo-5-oksoheksanian metylu (**18**). Aby otrzymać wolny

kwasy homoizocytrynowe należało usunąć wszystkie grupy ochronne ze związku **16**. Produkt zasadowej hydrolizy roztworem wodnym wodorotlenku potasowego oczyszczałam stosując chromatografię jonowymienną na złożu typu DOWEX [H⁺]. Otrzymałam kwas *D*-homoizocytrynowy w postaci gęstego, bezbarwnego oleju o skręcalności właściwej $[\alpha]_D -11$ (c1,5; aceton), którego strukturę potwierdziłam spektroskopią magnetycznego rezonansu jądrowego (Część eksperymentalna, podrozdział 4.3.5). W porównaniu do otrzymanego przeze mnie związku **19**, opisany w literaturze kwas charakteryzował się skręcalnością $[\alpha]_D -10$ (c2; aceton).⁶⁹

Kwas *D*-homoizocytrynowy pod działaniem diazometanu przekształciłam w jego ester trimetylowy **20**. Uzyskałam *D*-homoizocytrynian trimetylu w postaci bezbarwnego oleju o skręcalności właściwej $[\alpha]_D -14,5$ (c2; CHCl₃). Strukturę kwasu potwierdziłam spektroskopowo.

3.3. Opracowanie metod syntezy fluorowych analogów kwasów homocytrynowego i homoizocytrynowego

Istnieje ogólny podział związków fluorowanych na dwie klasy ze względu na ich strukturę, otrzymywanie i zastosowanie. Pierwsza obejmuje substancje, w których wszystkie, albo większość atomów wodoru, tworzących wiązanie z atomem węgla, zastąpiono atomem fluoru i są to związki wysoko-fluorowane. Druga, dotyczy tylko wymiany niektórych atomów wodoru na atomy fluoru i do tej klasy zaliczają się związki nisko-fluorowane.

3.3.1. Metody wprowadzania atomu fluoru do związków organicznych i stosowane odczynniki fluorujące

Znane są dwie, zasadniczo różne metody wprowadzania atomu fluoru do cząsteczek organicznych:²⁰

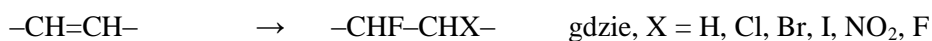
1. Fluorowanie we wczesnym etapie syntezy z możliwością modyfikacji w dalszych etapach. Metoda ta jest jednak czasochłonna i pracochłonna. W klasycznej chemii organicznej, praktycznie nie ma ona zastosowania, ponieważ wprowadzenie atomu fluoru do związków organicznych drastycznie zmienia ich właściwości chemiczne, dotyczy to zwłaszcza małych cząsteczek.

2. Wbudowywanie atomu fluoru do związku w końcowym etapie syntezy. Podczas takiego postępowania, zwykle nie narusza się innych, niż przekształcana, grup funkcyjnych czy wiązań wielokrotnych, obecnych w cząsteczce. Metoda ta jest lepsza, szybsza i bardziej wydajna niż pierwsza.

Odczynnik fluorujący powinien posiadać dwie podstawowe cechy: pierwsza i najważniejsza to selektywność działania, a druga to efektywność – wysokie wydajności w jak najkrótszym czasie.

Rozróżnia się kilka sposobów fluorowania określonych grup w cząsteczce, m.in.:²⁰

- Fluorowanie związane z reakcjami podwójnej wymiany:
 - atomów wodoru typu alifatycznego, aromatycznego i aldehydowego oraz halogenów na atom fluoru;
 - grupy hydroksylowej, tiolowej, aminowej, nitrowej, tosylowej oraz mesylowej na atom fluoru;
 - grupy karbonylowej na grupę difluorometylową;
 - grupy karboksylowej na grupę trifluorometylową;
 - pierścienie oksiranowe w reakcjach tego typu ulegają otwieraniu;
- Reakcje oksydacyjnego fluorowania:



Reakcje fluorowania związków organicznych mogą zachodzić, zarówno przy zastosowaniu odczynników fluorujących o charakterze nukleofilowym, jak i elektrofilowym, a także w reakcjach biegnących mechanizmem rodnikowym. Ogólnie do odczynników fluorujących można zaliczyć, m. in. fluorki metali (MF_n), HF, HBF_4 , fluorki halogenowe (XF_n), SF_4 , fluorofosforany, FCIO_3 , związki azotu zawierające fluor, F_2 , CF_3OF .²⁰

3.3.2. Synteza potencjalnych inhibitorów z zastosowaniem odczynnika DAST

W chemii fluoru^{26,78,79} szeroko stosowane są nukleofilowe reakcje fluorowania związków organicznych z użyciem odczynników fluorujących. W ostatnim czasie, najczęściej stosowane są odczynniki: Deoksyfluor $[(\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NSF}_3]$ oraz DAST $[(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{NSF}_3]$. W przeciwieństwie do tetrafluorku siarki, z którego są otrzymywane,⁸⁰ oraz pozostałych znanych odczynników fluorujących, reakcje

wprowadzania atomu fluoru do związków organicznych z udziałem Deoksyfluoru i DAST są jednoetapowe i w miarę proste do przeprowadzenia. Odczynniki te są mniej reaktywne w porównaniu z SF₄, ale znacznie bardziej selektywne. Ponadto zmniejszają ryzyko występowania reakcji eliminacji i przegrupowań.

Z użyciem w/w odczynników jednoetapowym, nukleofilowym reakcjom fluorowania ulegają związki z bardzo różnymi grupami funkcyjnymi takimi, jak: alkohole, aminoalkohole, diole, węglowodany, aldehydy, ketony, siarczki, sulfotlenki, tioestry, związki tiokarbonylowe, kwasy karbonylowe i ich chlorki, epoksydy, peptydy i ketoksymy.²⁶

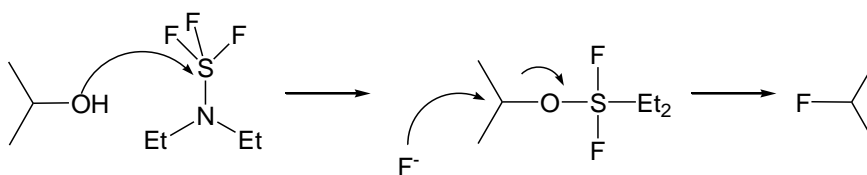
Wymianę grupy hydroksylowej na atom fluoru w tzw. reakcji deoksyfluorowania można przeprowadzić na dwa sposoby. Pierwszy polega na jednoetapowej reakcji substytucji nukleofilowej z użyciem jednego z odczynników fluorujących takich, jak: DAST, morfolino-DAST, Deoksyfluor, SF₄ czy SeF₄. Te reagenty są najczęściej stosowane do reakcji fluorowania alkoholi w tym pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowych, benzylowych oraz węglowodanów. Większość reakcji z Deoksyfluorem i DAST jest prowadzona w niskiej temperaturze ok. -78°C. Jednak w niektórych przypadkach konieczne jest prowadzenie reakcji w temperaturze pokojowej, w celu całkowitego przereagowania substratów. Z reguły tempo przebiegu reakcji, znacząco zależy od rodzaju używanego alkoholu; reaktywność związków hydroksylowych zmienia się następująco: alkohol benzylowy > 2° > 3° > 1°.⁷⁷ Reakcje z w/w odczynnikami fluorującymi są szybkie, zachodzą z wysoką wydajnością i prowadzone są w łagodnych warunkach. Grupy estrowe oraz atomy innych halogenów nie wchodzi w reakcje z omawianymi odczynnikami fluorującymi.

Z procesem fluorowania mogą współzawodniczyć reakcje uboczne takie, jak: przegrupowania karbokationów lub reakcje eliminacji. Przegrupowanie karbokationu występuje stosunkowo rzadko i zależy od rodzaju używanego reagenta. Na przykład, w wyniku fluorowania izobutanolu DAST'em powstaje 2-krotnie więcej fluorku izobutyli niż fluorku *tert*-butyli, podczas gdy w reakcji z kompleksem fluorującym - SeF₄•pirydyna, głównym produktem jest fluorek *tert*-butylowy.⁸¹ Obok reakcji fluorowania może zachodzić proces dehydratacji czyli eliminacji, którego przebieg zależy od stosowanego odczynnika fluorującego oraz budowy substratu.

Ponadto reakcje fluorowania, z odczynnikami fluorującymi, mogą zachodzić, zarówno z retencją, jak i inwersją konfiguracji na atomie węgla, przy którym

usytuowana jest grupa hydroksylowa. W reakcjach z cukrami,⁸² podczas wymiany reszty hydroksylowej na atom fluoru, zazwyczaj występuje inwersja, a tylko w niektórych przypadkach retencja konfiguracji. Podobną sytuację odnotowano podczas fluorowania steroidów.^{83,84}

Grupa hydroksylowa cząsteczki alkoholu w wyniku nukleofilowego ataku na cząsteczkę odczynnika fluorującego, odrywa z niego anion fluorkowy, łącząc się z atomem siarki (Rysunek 22). W obecności jonu fluorkowego o silnym charakterze nukleofilowym, połączenie tlen-siarka staje się dobrą grupą odchodzącą. Taki atak z reguły przebiega z inwersją konfiguracji, co pozwala na kontrolę stereochemiczną prowadzonych reakcji.⁷⁷



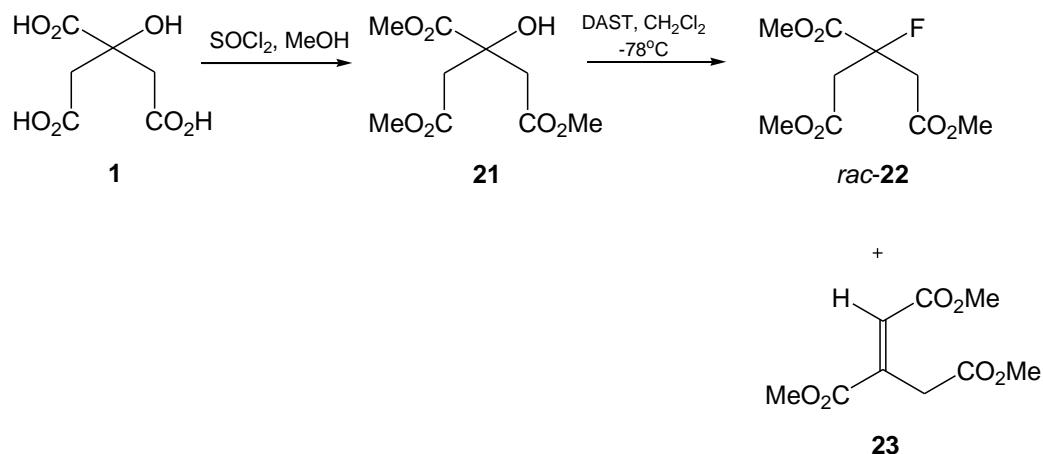
Rysunek 22. Uproszczony mechanizm reakcji deoksyfluorowania z zastosowaniem DAST

Druga metoda wymiany grupy hydroksylowej na atom fluoru, przebiega dwuetapowo. Substytucję nukleofilową poprzedza wprowadzenie reszty tosyłowej lub mesyłowej na ugrupowanie hydroksylowe alkoholu. Stosowanymi odczynnikami fluorującymi są w tej reakcji fluorek tetrabutylammoniumowy (TBAF)^{78,85} lub fluorek potasu w obecności eteru koronowego.^{86,87} TBAF świetnie nadaje się do przekształcania alkoholi pierwszorzędowych w odpowiednie fluorki. Przy alkoholach wyżej rzędowych, stosowanie TBAF jako reagenta prowadzi często do powstawania izomerycznych pochodnych w wyniku reakcji eliminowania lub innych produktów ubocznych.⁸⁸

3.3.2.1. Synteza 2-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylanu trimetylu oraz jego homologu

W oparciu o literaturę postanowiłam wykorzystać do reakcji wymiany grupy hydroksylowej na atom fluoru, w pochodnych kwasów hydroksykarboksylowych, dostępny komercyjnie odczynnik fluorujący DAST.^{77,78,84,89} Za tym reagentem przemawiał fakt, że DAST jest mniej lotny w porównaniu z innymi odczynnikami fluorującymi, a warunki prowadzenia reakcji są dosyć łagodne. Zdecydowałam się go użyć w syntezie fluorowych pochodnych kwasu cytrynowego, homocytrynowego i homoizocytrynowego.

Reakcja taka przebiegała w jednym etapie i polegała na nukleofilowym podstawieniu grupy hydroksylowej cytrynianu trimetylowego (**21**) atomem fluoru (Rysunek 23).



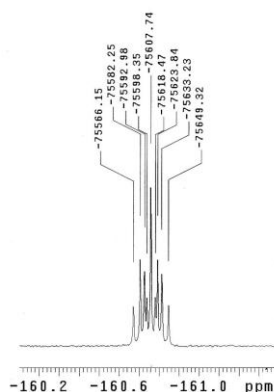
Rysunek 23. Otrzymywanie 3-fluorodehydroksycytrynianu trimetylu (**22**).

Ze względu na niestabilność termodynamiczną DAST-u, reakcję prowadziłam w niskiej temperaturze, a przebieg kontrolowałam przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Z obrazu chromatograficznego mieszaniny reakcyjnej wynikało, że następowało całkowite przekształcenie substratu w pożądany, główny produkt – 2-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylan trimetylu (3-fluorodeoksycytrynian trimetylu) (**22**). Jednak po izolacji i oczyszczeniu za pomocą flash chromatografii kolumnowej otrzymywałam produkt z wydajnością tylko 12%. Jako drugi, uboczny produkt izolowałam *trans*-akonitynian trimetylu[†] (**23**), który powstawał w wyniku reakcji eliminacji fluorowodoru. Ponieważ proces izolacji związku **22** z zastosowaniem żelu krzemionkowego nie dawał zadowalających efektów, przetestowałam złoża z tlenku glinu, zarówno o charakterze obojętnym, jak i zasadowym. Jednak izolacja produktu fluorowania na tego typu złożach nie przebiegała zgodnie z oczekiwaniem. Problemem pozostało rozdzielenie dwóch, głównych składników mieszaniny poreakcyjnej. Ich wzajemne oddziaływanie utrudniało separację, zarówno na żelu krzemionkowym, jak i na tlenku glinu. Ponadto z upływem czasu skład mieszaniny zmieniał się na korzyść *trans*-akonitynianu trimetylu, którego struktura ze względu na obecność sprzężonego układu wiązań podwójnych (dwóch ugrupowań C=O oraz C=C) jest termodynamicznie i chemicznie trwalsza, a tym samym bardziej korzystna energetycznie.

[†] Pomimo, że powyższe kwasy nienasycone zawierają tripodstawione wiązanie podwójne, w niniejszej pracy będę stosowała nomenklaturę, używaną w literaturze biochemicznej z przedrostkami *cis*- oraz *trans*-, uwzględniającą rozmieszczenie ugrupowań metoksykarbonylowych (CO_2CH_3) na atomach węgla C3 i C4 po tej samej lub po różnej stronie wiązania podwójnego.

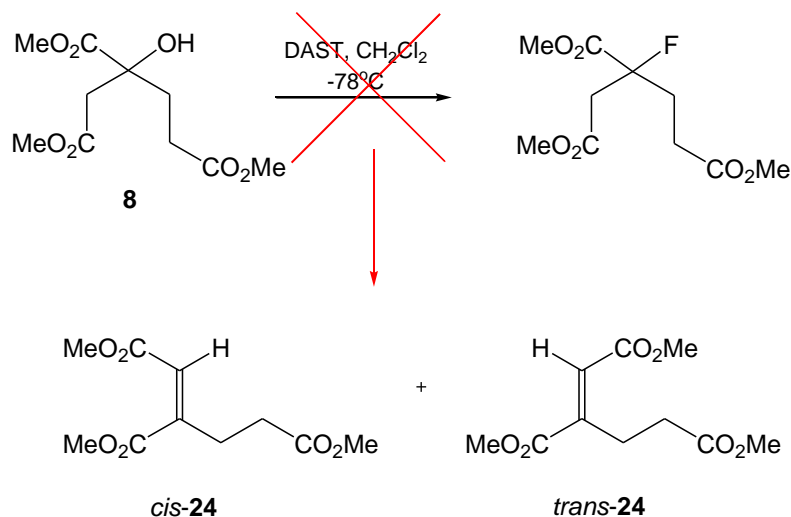
Stwierdziłam, że efektywną metodą rozdzielania w/w mieszaniny związków jest technika SPE (*solid phase extraction*) czyli ekstrakcji do fazy stałej. Zastosowałam technikę SPE w układzie faz normalnych. Z uwagi na fakt, że rozdzielana mieszanina miała charakter średnio polarny, proces oczyszczania prowadziłam w kolumnkach polipropylenowych wypełnionych żelem krzemionkowym o pojemności 5ml, stosując elucję gradientową. Uzyskałam *trans*-akonitynian trimetylu (**23**) z wydajnością 27% oraz 2-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylan trimetylu (56%), który dalej oczyszczałam z zastosowaniem półpreparatywnego HPLC i ostatecznie otrzymałam produkt z zadowalającą wydajnością 45%. Metoda ekstrakcji do fazy stałej stanowiła szybki i prosty sposób rozdzielania mieszaniny poreakcyjnej. Największą zaletą tej techniki była jej wysoka skuteczność separacji w porównaniu z metodą chromatografii kolumnowej oraz bardzo niskie zużycie stosowanych rozpuszczalników.

Strukturę związków potwierdziłam spektroskopią protonowego i węgłowego magnetycznego rezonansu jądrowego. Ponadto stwierdziłam obecność atomu fluoru w strukturze produktu **22** widmem ^{19}F NMR (Rysunek 24).



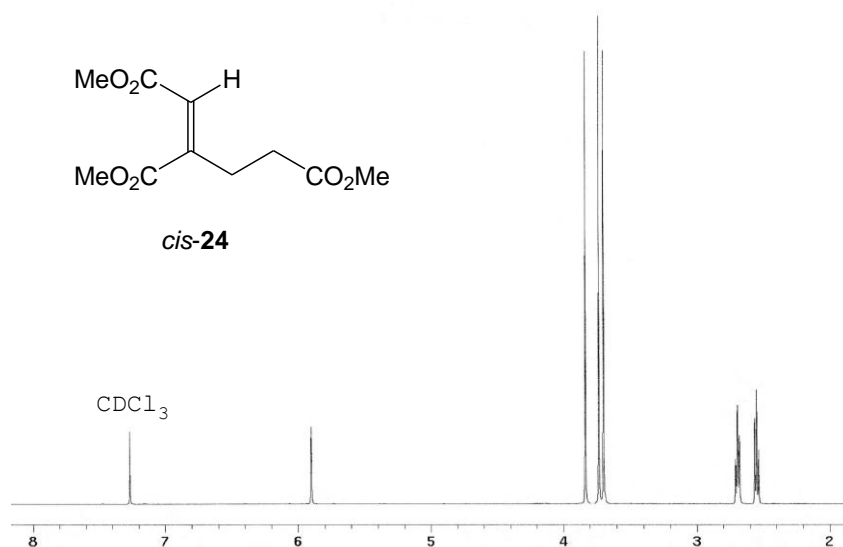
Rysunek 24. Widmo ^{19}F NMR 2-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylanu trimetylu (rozp. CDCl_3).

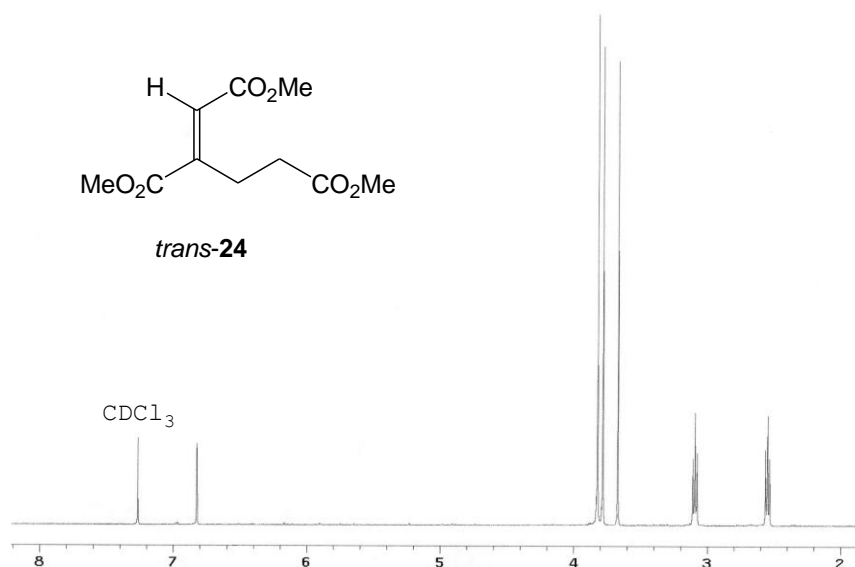
Także homocytrynian trimetylu (**8**) wykorzystałam jako ważny substrat w reakcji fluorowania odczynnikiem DAST. Z założenia podstawieniu atomem fluoru miała ulegać grupa hydroksylowa związku **8**. Teoretycznie, z uwagi na analogiczną do cytrynianu trimetylu budowę substratu – homocytrynianu trimetylu, różniącego się jedynie dodatkową grupą metylenową w cząsteczce, zachowanie identycznych warunków reakcji fluorowania powinno prowadzić do analogicznego produktu (Rysunek 25).



Rysunek 25. Synteza *cis*- i *trans*-homoakonitrynianu trimetylu.

Niestety, w efekcie działania DAST na homocytrynian trimetylu powstawała mieszanina dwóch stereoizomerów *cis*- i *trans*-homoakonitrynianu trimetylu. Najprawdopodobniej tworzący się 3-fluorodeoksyhomocytrynian trimetylu w warunkach reakcji ulegał przemianom w homoakonitrynian poprzez eliminację cząsteczki fluorowodoru. W rezultacie powstawał produkt eliminowany, który był stabilizowany układem sprzężonych wiązań wielokrotnych. Strukturę produktów potwierdziłam spektroskopią ^1H i ^{13}C NMR (Część eksperymentalna, 4.5.1). Na Rysunku 26 przedstawiłam widma ^1H NMR, na których jednoznacznie widać różnice w przesunięciach chemicznych protonów w dwóch związkach *cis*- i *trans*-**24**.



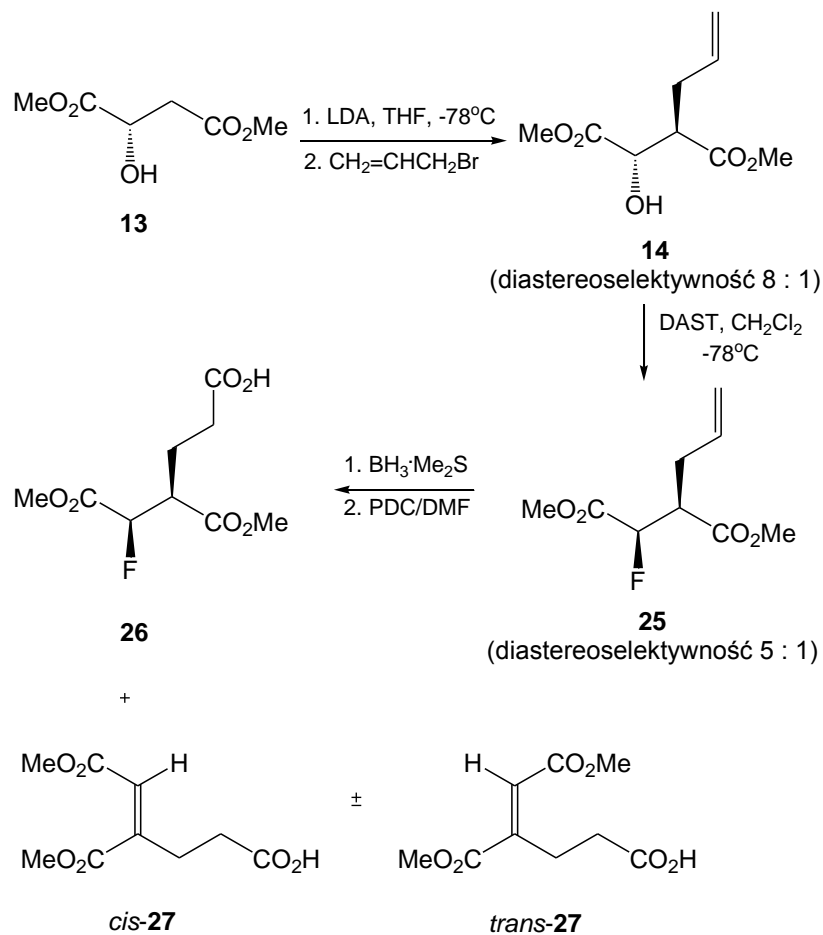


Rysunek 26. Widma ¹H NMR *cis*- i *trans*-homoakonitynianów trimetylu.

3.3.2.2. Synteza (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-metoksykarbonylowodoroadypinianu 1-metylu

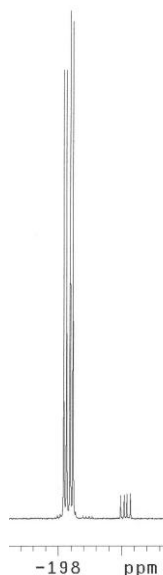
Jak już wcześniej wspomniałam, enzymy szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego stanowią istotny cel molekularny w chemoterapii przeciwgrzybowej. Wobec tego moja praca polegała na zaprojektowaniu i zsyntezowaniu związków będących analogami kwasu homoizocytrynowego, o charakterze potencjalnych inhibitorów enzymów tego szlaku. Jednym z otrzymanych związków miał być kwas 2-fluorodeoksyhomoizocytrynowy, następnie przebadany pod względem aktywności przeciwgrzybowej i zdolności inhibicyjnych w stosunku do dehydrogenazy homoizocytrynianu. Omówienie metody syntezy przedstawiłam poniżej, a schemat reakcji na Rysunku 27.

Reakcja wymiany grupy hydroksylowej na atom fluoru pod wpływem DAST zazwyczaj przebiega w jednym etapie i z inwersją konfiguracji centrum stereogenicznego. Dlatego substratem w syntezie kwasu 2-fluorodeoksyhomoizocytrynowego był *L*-jabłczan dimetylu. W wyniku alkilowania bromkiem allilu enolanu, tworzącego się pod wpływem LDA, powstawał (2*S*,3*R*)-2-allilobjabłczan dimetylu z diastereoselektywnością 8 : 1. Następnie poddałam związek **14** reakcji substytucji grupy hydroksylowej na atom fluoru, działając DAST. Po izolacji produktu z mieszaniny reakcyjnej otrzymałam jasnożółty oleisty 2-fluoro-3-allilobursztynian dimetylu (**25**) z diastereoselektywnością 5 : 1 o skręcalności $[\alpha]_D^{20} +2,5$ (c1,7; CHCl₃).



Rysunek 27. Strategia syntezy 2-fluorodeoksyhomoizocytrynianu trimetylu.

Reakcja fluorowania związku **14** przebiegała z wysoką wydajnością 89%. Strukturę związku **25** potwierdziłam spektroskopią ¹H, ¹³C oraz ¹⁹F NMR.



Obecność atomu fluoru w strukturze związku potwierdziłam za pomocą widma ¹⁹F NMR, na którym widoczne są dwa dublety dubletów o stałych sprzężenia spinowo-spinowego ³J_{HF} = 21Hz oraz ²J_{HF} = 47Hz (Część eksperymentalna, podrozdział 4.6.2). Związek **25** występuje z niewielką domieszką drugiego diastereoizomeru, o czym świadczy obecność drugiego, mniejszego *dd*.

Rysunek 28. Widmo ¹⁹F NMR 2-fluoro-3-allilubursztynianu dimetylu.

W wyniku reakcji hydroborowania oraz utleniania pochodnej fluorowej **25** powstała mieszanina kilku produktów. Po izolacji z wykorzystaniem flash chromatografii głównym produktem był 2-fluoro-3-metoksykarbonyloadypinian 1-metylu (**26**), występujący w mieszaninie z *cis*- i *trans*-wodorohomoakonitynianami 1,2-dimetylu (**27**). Na podstawie widma ^1H NMR mieszaniny poreakcyjnej oszacowałam jej skład w stosunku 7 : 3 : 1 odpowiednio 2-fluoro-3-metoksykarbonyloadypinian 1-metylu/*cis*-/*trans*-wodorohomoakonitynian 1,2-dimetylu. Zdecydowałam się na rozdzielanie składników mieszaniny za pomocą techniki SPE. Rozdzielanie tą metodą okazało się nieefektywnym, a ponadto niekorzystnie wpływało na skład ilościowy produktów mieszaniny. Po rozdzieleniu uzyskiwałam bowiem mieszaninę związków **26**, *cis*-**27** i *trans*-**27** w stosunku 1 : 1 : 1. Prawdopodobnie w warunkach rozdzielania fluoro-pochodna ulega reakcji eliminacji na korzyść najtrwalszej termodynamicznie struktury *trans*-**27**. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku rozdzielania mieszaniny 3-fluorodeoksycytrynianu trimetylu i *trans*-akonitynianu trimetylu.

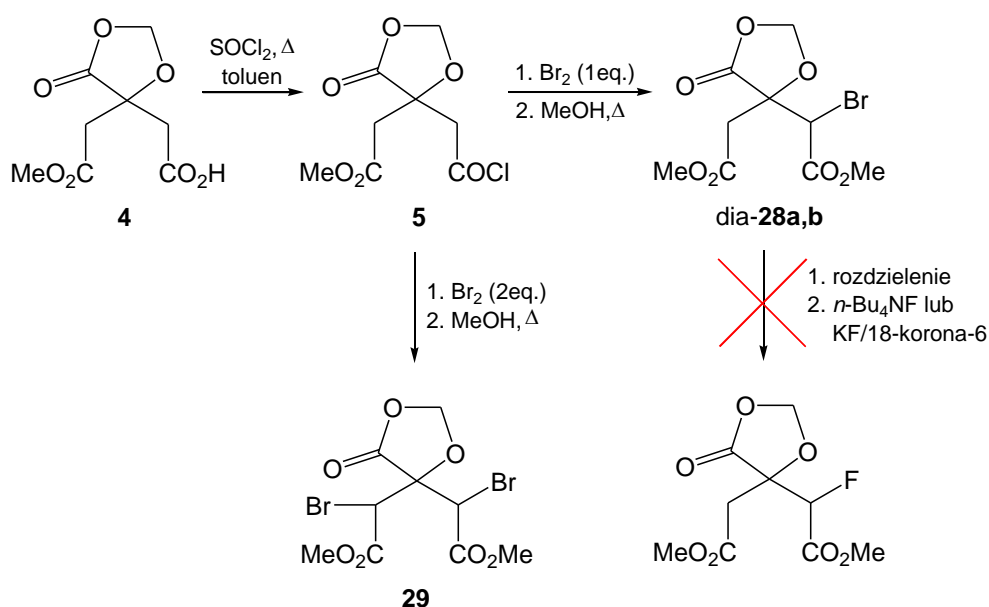
3.3.3. Synteza bromopochodnych kwasu metylenocytrynowego oraz reakcje ich fluorowania z zastosowaniem TBAF i KF.

Jony fluorkowe są silnie solwatowane w rozpuszczalnikach protycznych i tworzą silne pary jonowe w większości rozpuszczalników aprotycznych. Z tego względu, fluorki są słabymi nukleofilami w rozpuszczalnikach protycznych, natomiast w aprotycznych, tworzenie par jonowych musi być przewyższone na korzyść zwiększenia nukleofilowości jonu fluorkowego. Taki efekt można uzyskać, stosując związki o charakterze kationów z dużą zawadą steryczną, które minimalizują możliwość tworzenia się par jonowych przez delokalizację ładunku dodatniego. Jednym z takich reagentów jest fluorek tetra-*n*-butyloammonioowy (TBAF).⁷⁸

Według literatury,^{90,91} przy użyciu fluorku tetra-*n*-butyloammonioowego można wymienić atomy innych halogenów lub grupę tosyłową, w związkach zawierających atom węgla typu allilowego, benzyłowego, pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowy na atom fluoru. Zaletą tej metody fluorowania jest to, że reakcja biegnie w łagodnych warunkach, w temperaturze pokojowej i pod ciśnieniem atmosferycznym. Niestety dostęp wilgoci zmniejsza wydajność reakcji. Wadą jest również powstawanie produktów ubocznych, najczęściej produktów eliminacji. Stąd Bérubé i współ.⁹² opracowali metodę dehydrohalogenowania z użyciem TBAF.

Inna metoda wprowadzania atomu fluoru do cząsteczki związku organicznego, przebiegająca w łagodnych warunkach, wykorzystuje możliwości tworzenia tzw. „gołego” anionu fluorkowego w procesie kompleksowania fluorku potasu przez etery koronowe – (ang. *18-crown-6*).^{86,87} Najkorzystniejszy przebieg reakcji obserwowano w rozpuszczalnikach aprotycznych typu acetonitryl czy benzen. Oczywiście, podobnie jak w przypadku reakcji z TBAF, obserwowano powstawanie produktów, zarówno substytucji, jak i/lub eliminacji. Tworzące się mieszaniny produktów świadczą, że tzw. „goły” anion fluorkowy posiada jednocześnie charakter nukleofilowy, jak i zasadowy.⁸⁶

W kolejnym etapie mojej pracy postanowiłam przetestować możliwości wymiany atomu bromu na atom fluoru przy zastosowaniu omawianych odczynników fluorujących. W tym celu musiałam opracować warunki wprowadzania atomu bromu do cząsteczek kwasu cytrynowego i jego pochodnych. Założyłam, że substratem wyjściowym w dalszych syntezach będzie monoester metylowy kwasu metylenocytrynowego (**4**). Wodorometylenocytrynian metylu (*rac*-**4**) zawiera w swojej strukturze wolną grupę karboksylową, sąsiadującą z ugrupowaniem metylenowym. Postanowiłam, wprowadzić atom bromu do grupy α -metylenowej standardową procedurą Hella-Volharda-Zelinsky’ego, a następnie wymienić go w reakcji substytucji nukleofilowej na atom fluoru (Rysunek 29).



Rysunek 29. Strategia syntezy 2-fluorometylenocytrynianu dimetylu.

Wiadomo, że w reakcji Hella-Volharda-Zelinsky’ego⁹³ rodzaj wprowadzanego atomu halogenu nie zależy od rodzaju halogenku kwasowego, a tylko od dodawanego do reakcji wolnego halogenu. Stąd reakcje bromowania bezwodnym bromem poddawałam

chlorek kwasowy **5**. Podczas tej reakcji zaobserwowałam powstawanie dwóch diastereoizomerów 2-bromometylenocytrynianu dimetylu (**28a,b**) w ilości stechiometrycznej. Związki te rozdzieliłam przy użyciu flash chromatografii kolumnowej. W przypadku stosowania 2-krotnego nadmiaru bromu w stosunku do początkowej ilości substratu, w reakcji monoestru **4** z PBr₃ powstawała dibromopochodna **29** (Część eksperymentalna, 4.7.2), w postaci białych kryształów. W tym przypadku podstawieniu atomem bromu ulegają, zarówno jedna, jak i druga grupa metylenowa związku **5**. Struktury bromopochodnych potwierdziłam przy pomocy spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.

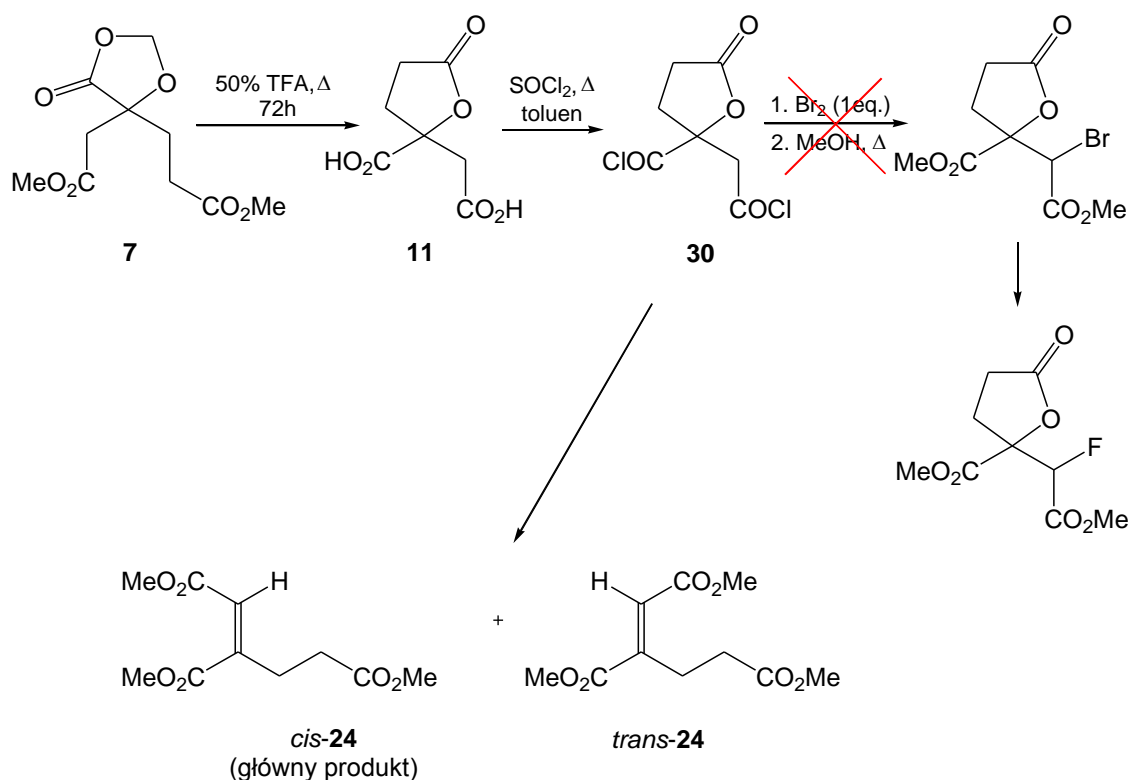
Następnie przebadalam przebieg reakcji bromoestrów z fluorkiem tetra-*n*-butyloammoniumowym (TBAF) oraz z fluorkiem potasu. Wprowadzanie atomu fluoru przy zastosowaniu TBAF nie prowadziło do pożądaných produktów podstawienia nukleofilowego. Z drugiej strony, sprawdziłam działanie fluorku potasu na estry kwasów bromokarboksylowych w obecności kilku eterów koronowych takich, jak: 18-korona-6, dicykloheksylo-18-korona-6 oraz dibenzo-18-korona-6. Wybrałam etery koronowe typu 18-korona-6, ponieważ posiadają one w swojej strukturze „wnękę” o rozmiarach odpowiadających wielkości kationu potasowego, co skutkuje efektywną solwatacją kationu pochodzącego z KF i wytworzeniem wolnego anionu fluorkowego.⁸⁶ W reakcji fluorku potasu w obecności eteru koronowego 18-korona-6 obserwowałam proces epimeryzacji jednego z diastereoizomerów 2-bromometyleno-cytrynianu (**28a**) w drugi (**28b**). Prawdopodobnie tzw. „goły” anion fluorkowy, generowany *in situ*, reaguje bardziej jak zasada niż jako odczynnik nukleofilowy. W związku z tym następuje oderwanie protonu i jego ponowne przyłączenie z drugiej strony cząsteczki, dochodzi tym samym do procesu epimeryzacji. Podobną sytuację obserwowałam podczas stosowania dicykloheksylo-18-korona-6. Natomiast w przypadku reakcji prowadzonej w obecności dibenzo-18-korona-6 reakcja przebiegała z częściowym przereagowaniem substratu **28a** w jego epimer **28b**, co obserwowałam za pomocą chromatografii TLC, zauważając plamki, zarówno dla związku **28a**, jak i **28b**. Struktury obu diastereoizomerów potwierdziłam widmami spektroskopii ¹H oraz ¹³C NMR (Część eksperymentalna, podrozdział 4.7.1).

3.3.4. Synteza kwasów *cis*- i *trans*-homoakonitynowych

Jak już wspominałam, kwas homocytrynowy jest związkiem wysoce niestabilnym chemicznie, dlatego wszystkie próby otrzymywania tego związku w postaci wolnej,

kończą się najczęściej izolowaniem jego trwalszej postaci, a mianowicie γ -laktonu kwasu homocytrynowego. Z uwagi na to, postanowiłam sprawdzić możliwości wprowadzenia atomu bromu do cząsteczki tego γ -laktonu, a następnie wymiany na atom fluoru (Rysunek 30). Tak zaplanowana synteza kwasu fluorohomocytrynowego, jako potencjalnego inhibitora enzymu szlaku kwasu α -aminoadypinowego biosyntezy *L*-lizyny, również prowadziłyby do γ -laktonu kwasu fluorohomocytrynowego. W literaturze istnieje tylko jedna wzmianka dotycząca syntezy laktonu kwasu fluorohomocytrynowego.⁹⁴ W wyniku reakcji kondensacji α -ketoglutaranu di-*tert*-butylu z enolanem *tert*-butylowym fluoroocetanu litu powstaje fluorohomocytrynian tri-*tert*-butylu, który po ogrzewaniu z 10*N* kwasem solnym daje lakton kwasu fluorohomocytrynowego.

Opracowując strategię wprowadzania atomu fluoru do cząsteczki γ -laktonu kwasu homocytrynowego, brałam pod uwagę łagodne warunki prowadzenia wszystkich etapów syntezy. Związek **11** jest trwałą cząsteczką o charakterze kwasu – posiada dwie wolne grupy karboksylowe w swojej strukturze. Podobnie jak ma to miejsce w wodorometylenocytrynianie metylu **4**, w położeniu α do jednej z nich ulokowana jest grupa metylenowa. Zdecydowałam się więc na wprowadzenie atomu bromu do grupy α -metylenowej w reakcji Hella-Volharda-Zelinsky’ego (Rysunek 30).



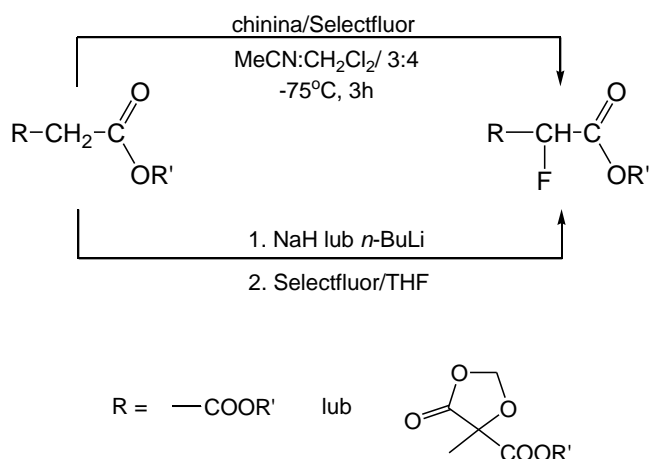
Rysunek 30. Strategia syntezy estru dimetylowego laktonu kwasu fluorohomocytrynowego.

W tym celu γ -lakton kwasu homocytrynowego (**11**) przekształciłam w jego dichlorek **30** działaniem chlorkiem tionyłu. Następnie bromowałam tak powstały chlorek kwasowy **30** bezwodnym bromem obecności PBr_3 . Niestety po tym etapie produktami reakcji okazały się być *cis*-homoakonitynian trimetylu, jako produkt główny (Część eksperymentalna, rozdział 4.5) oraz *trans*-homoakonitynian trimetylu, a nie tak jak oczekiwałam diester metylowy bromolaktonu kwasu homocytrynowego (Rysunek 30). Prawdopodobnie w warunkach reakcji równocześnie zachodzi bromowanie i otwieranie się pierścienia laktonowego, a następnie wtórna eliminacja cząsteczki bromowodoru. Uniemożliwia to dalsze przeprowadzenie reakcji fluorowania przy pomocy fluorku potasu w obecności eteru koronowego.

3.3.5. Testowe reakcje fluorowania z wykorzystaniem elektrofilowych odczynników fluorujących

Poza wymianą grupy hydroksylowej i atomu bromu na fluor, podjęłam również próby elektrofilowej addycji atomu fluoru do wiązania podwójnego, zarówno z odczynnikiem fluorującym tzw. Selectfluorem, jak i tradycyjnym HF w pirydynie.

Selectfluor należy do znanych odczynników fluorujących o charakterze elektrofilowym o wielu zastosowaniach.^{95,96} W celu otrzymania pochodnych α -fluorkarbonylowych zastosowałam dwie różne metody fluorowania (Rysunek 31). Jako modelowe substraty w reakcjach fluorowania postanowiłam wykorzystać: malonian dietylu oraz metylenocytrynian dimetylu, posiadające w swojej strukturze kwaśne protony α .



Rysunek 31. Reakcje fluorowania z Selectfluorem.

W pierwszym wariantcie jako reagent fluorujący stosowałam kompleks chininy z Selectfluorem.⁹⁷ Niewielki nadmiar chininy w stosunku do odczynnika fluorującego miał za zadanie przyspieszenie deprotonowania substratu, w wyniku czego następowałaby addycja atomu fluoru do cząsteczki. Druga wersja opierała się na oderwaniu α -protonu z molekuly substratu przez wodorek sodowy lub *n*-butylolit, a następnie tak otrzymany karboanion traktowałam reagentem fluorującym – Selectfluorem.⁹⁸

Niestety wszystkie powyższe próby, zarówno, gdy substratem był malonian dietylu, jak i metylenocytrynian dimetylu, zakończyły się niepowodzeniem. Nie izolowałam oczekiwanego produktu reakcji.

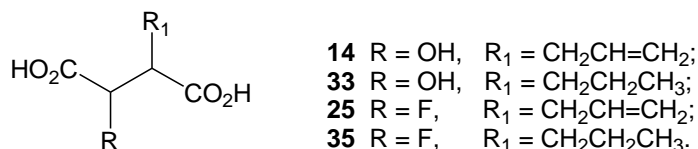
Ponadto przeprowadziłam reakcję fluorowania z wykorzystaniem 70% HF w pirydynie.⁹⁹ Polegała ona na addycji elektrofilowej fluorowodoru do wiązania podwójnego substratu, którym był *trans*-akonitynian trimetylu (**23**). Do przygotowanego w buteleczce polietylenowej roztworu 70% HF/Pyr, ochłodzonego na łaźni lodowej, dodawałam *trans*-akonitynian trimetylu. W celu polepszenia rozpuszczalności nienasyconego substratu w mieszaninie HF/Pyr, reakcję prowadziłam w chlorku metylenu. Przebieg reakcji śledziłam chromatograficznie. Niestety, tak jak w reakcjach z Selectfluorem, nie zauważyłam produktu reakcji fluorowania. Prawdopodobnie przyczyną jest struktura cząsteczki substratu, która posiada stabilny układ sprzężonych wiązań podwójnych. Nawet, gdy reakcja zachodziła z przyłączeniem fluorowodoru do centrum elektrofilowego substratu, to i tak preferowanym produktem reakcji jest związek eliminowany. Stan równowagi omawianych reakcji jest przesunięty w stronę substratu.

3.3.6. Synteza kwasów dikarboksyłowych – potencjalnych inhibitorów dehydrogenazy homoizocytrynianu

Po dokładnej analizie etapów szlaku kwasu α -aminoadypinowego, postanowiłam wykorzystać jako cel molekularny dehydrogenazę homoizocytrynianu. Pierwsze próby projektowania i syntezy potencjalnych inhibitorów dehydrogenazy homoizocytrynianu podjęli Yamamoto i in.,⁴⁸ którzy modyfikowali łańcuch boczny powiązany z atomem węgla C3 w cząsteczce kwasu homoizocytrynowego.

Zaprojektowałam i zsyntezowałam związki, pochodne kwasu 2-hydroksy- oraz 2-fluorobursztynowego, które jako analogi substratu – dehydrogenazy homoizocytrynianu mogą okazać się potencjalnymi inhibitorami tego enzymu. Modyfikacje kwasu

homoizocytrynowego polegają na zamianie grupy metylenokarboksylowej C5/C6 na podstawniki etylowy lub winylowy. Uważam, że szczególnie pochodne kwasu 3-propylo- oraz 3-allilo-2-fluorobursztynowego, ze względu na obecność atomu fluoru na atomie węgla C2, a tym samym zmienione właściwości fizykochemiczne, mogą sprzyjać wiązaniu się do centrum aktywnym enzymu zamiast substratu (Rysunek 32).

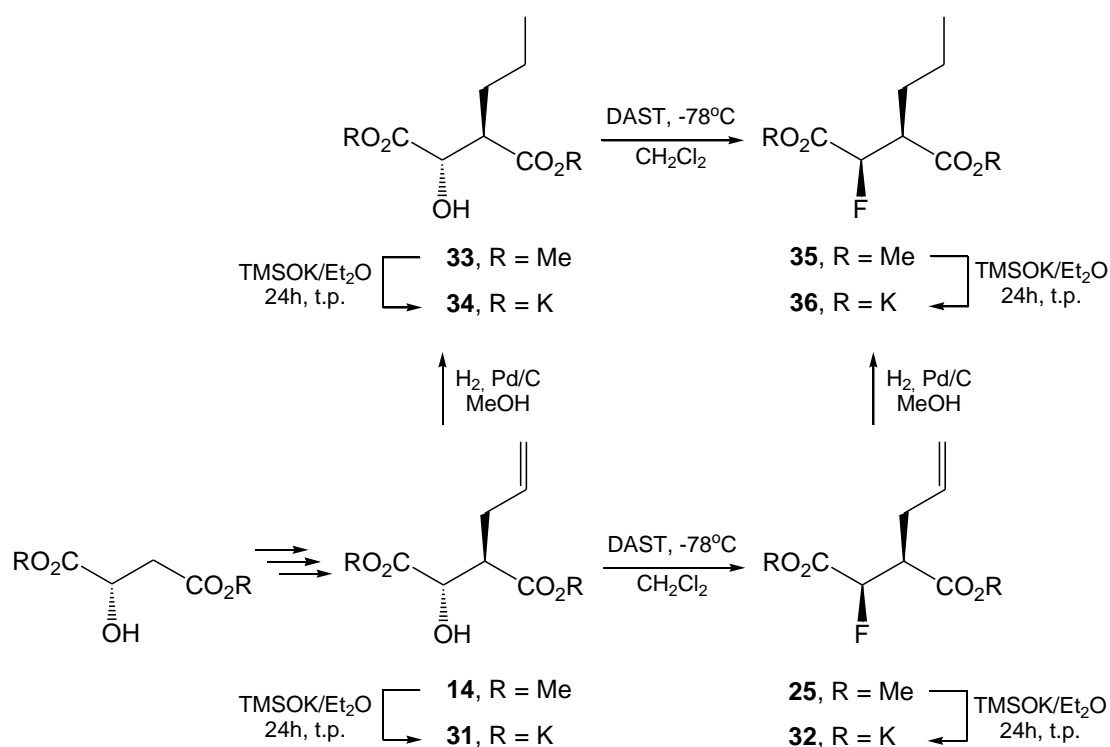


Rysunek 32. Struktury kwasów dikarboksylowych - potencjalnych inhibitorów dehydrogenazy homoizocytrynianu

Synteza omawianych pochodnych kwasów dikarboksylowych wykorzystuje jako substrat 3-allilójabłczan dimetylu (**14**), który otrzymałam z *L*-jabłczanu dimetylu (podrozdział 4.6.1., Rysunek 27).

W strukturze związku **14** jest obecne wiązanie podwójne, do którego zdecydowałam się przyłączyć cząsteczkę wodoru. Proces wodorolizy prowadziłam wodorem generowanym *in situ* w obecności katalizatora – 10% Pd/C. Przebieg reakcji hydrogenowania kontrolowałam przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej w układzie D. Zakończenie reakcji zaobserwowałam po upływie 4h. Produkt izolowałam przez odsączenie katalizatora i oddestylowanie rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymałam (2*S*,3*R*)-3-propylojabłczan dimetylu (**33**) o skręcalności $[\alpha]_D +7,6$ (*c*1,3; CHCl₃) z wysoką wydajnością 94%. Po przekształceniu nienasyconego podstawnika w łańcuchu bocznym 3-allilójabłczanu dimetylu w alkiłowy, uzyskałam trwały, nietlotny produkt **33**. Fakt ten utwierdził mnie w przypuszczeniu, że grupa allilowa wpływa na zwiększenie lotności związku **14**.

Drugi typ modyfikacji kwasu homoizocytrynowego polegał na podstawieniu grupy hydroksylowej w związku **14** atomem fluoru. Jako odczynnik fluorujący zastosowałam DAST, podobnie jak podczas syntezy (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-metoksykarbonylowodoroadypinianu 1-metylu (podrozdział 4.6). W wyniku reakcji substytucji otrzymałam (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-allilobursztynian dimetylu (**25**) ze zmienioną konfiguracją z *S* na *R* przy drugim atomie węgla. Syntezę (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-propylobursztynianu dimetylu (**35**) przeprowadziłam w dwojaki sposób (Rysunek 33).



Rysunek 33. Synteza kwasów dikarboksylowych - analogów kwasu homoizocytrynowego.

W pierwszej metodzie uwodorniłam wiązanie podwójne allilowego podstawnika w związku **25**, w identycznych warunkach jak dla (2*S*,3*R*)-3-propylojabłczanu dimetylu (**33**). Sposób ten okazał się bardzo wydajnym, ponieważ fluoropochodna **35** powstawała aż z 90% wydajnością. Ponadto uzyskiwałam produkt, nie wymagający dodatkowego oczyszczania, w formie bezbarwnego oleju o skręcalności $[\alpha]_D +5$ (*c*0,8; CHCl₃). Drugi sposób syntezy związku **35**, polegał na reakcji fluorowania (2*S*,3*R*)-3-*n*-propylojabłczanu dimetylu (**33**) z wykorzystaniem odczynnika DAST. W przypadku tej metody, z mieszaniny reakcyjnej izolowałam surowy produkt, który oczyszczałam przy zastosowaniu flash chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Obecność atomu fluoru w związku **35** potwierdziłam widmem ¹⁹F NMR w postaci dubletu dubletów o ³J_{HF} = 23Hz oraz ²J_{FF} = 47Hz (Część eksperymentalna, podrozdział 4.8.5). Podobnie jak w przypadku związku **25**, pochodna **35** występuje z niewielką domieszką drugiego diastereoizomeru, co widać w postaci drugiego, mniejszego *dd*.

Korzystniejszą okazała się metoda I syntezy (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-propylobursztynianu dimetylu (**35**) z uwagi na lepszą sumaryczną wydajność.

Zsyntezowane związki miały być wykorzystane do badań biochemicznych, dlatego powinny się charakteryzować dobrą rozpuszczalnością w systemach biologicznych. Wszystkie uzyskane pochodne, w postaci estrów **14**, **25**, **33** i **35**, przekształciłam w sole

potasowe: **31**, **32**, **34** oraz **36**. Pomimo tego, że otrzymane związki, również te zawierające w swojej strukturze atom fluoru, wykazywały dobrą stabilność chemiczną w temperaturze pokojowej, to z uwagi na ich budowę, nie chciałam stosować drastycznych warunków podczas hydrolizy zasadowej estrów metylowych. Użycie silnej zasady typu wodorotlenku potasu mogłoby spowodować eliminację fluorowodoru z cząsteczki i powstanie trwalszej struktury α,β -nienasyconych kwasów, co obserwowałam w przypadku akonitynianu i homoakonitynianu trimetylu. Dlatego też do hydrolizy estrów metylowych wykorzystałam trimetylosilanolan potasu (TMSOK) w bezwodnym eterze dietylowym.¹⁰⁰ Reakcja ta jest prosta, szybka i zachodzi z wysokimi wydajnościami.

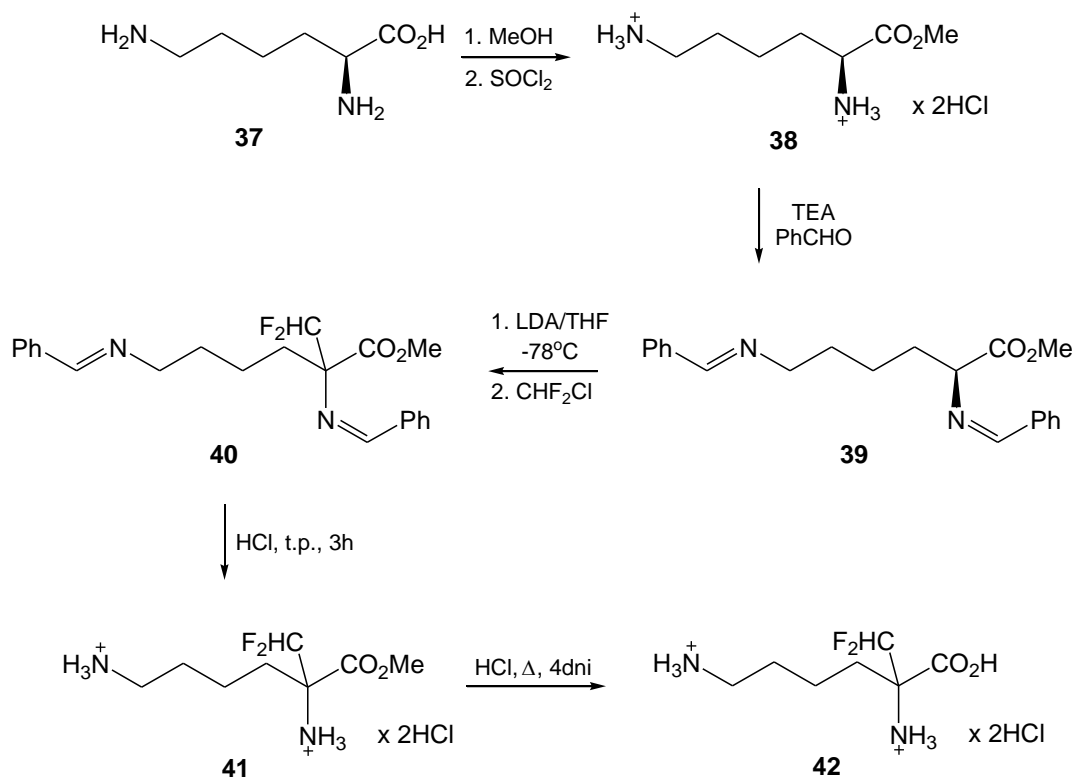
Zastosowanie TMSOK zamiast tradycyjnej zasady ma dwie unikalne zalety. Jedną z nich jest dobra rozpuszczalność trimetylosilanolanu potasu w rozpuszczalnikach organicznych. Drugą, jest natomiast łatwe usuwanie połączenia O–Si w bardzo łagodnych warunkach. Ponadto w wyniku reakcji z trimetylosilanem potasu, odpowiedni produkt w postaci soli potasowej strąca się jako osad z mieszaniny reakcyjnej, a wszystkie zanieczyszczenia ulegają wymyciu. Z uwagi na stosowany reagent nie ma obawy, że będą zachodziły reakcje wtórne.

Zarówno estry metylowe **14**, **25**, **33** i **35**, jak i sole potasowe **31**, **32**, **34** i **36** zostały przekazane do badań biochemicznych. Wykonano oznaczenie odpowiednio aktywności przeciwgrzybowej w stosunku do komórek grzybowych szczepów: *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* oraz *C. krusei* oraz aktywności inhibicyjnej wobec enzymu dehydrogenazy homoizocytrynianowej.

3.4. Synteza 2-difluorometylolizyny

2-Difluorometylolizyna (DMFL) jest analogiem 2-difluorometyloornityny (DFMO) znanego, fluorowanego inhibitora dekarboksylazy ornityny.^{7,101,102} Obecność ugrupowania difluorometylowego zamiast atomu wodoru α znacznie zmienia właściwości fizyko-chemiczne aminokwasu oraz może istotnie wpłynąć na jego zdolność oddziaływania z centrum wiążącym enzymu. *L*-Lizyna jest końcowym produktem szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego. Dowiedziono, że aminokwas ten może hamować syntazę homocytrynianą z *Saccharomyces cerevisiae* na zasadzie sprzężenia zwrotnego, co potwierdza, że jest ona istotnym punktem kontroli szlaku kwasu α -aminoadypinowego.^{103,104,105} Postanowiłam zbadać, czy difluorometylolizyna

hamuje aktywność enzymów w/w szlaku. W tym celu zdecydowałam się powtórzyć syntezę difluorometylolizyny w oparciu o metodę zaproponowaną przez Bey i in.,¹⁰⁶ modyfikując niektóre z etapów (Rysunek 34).



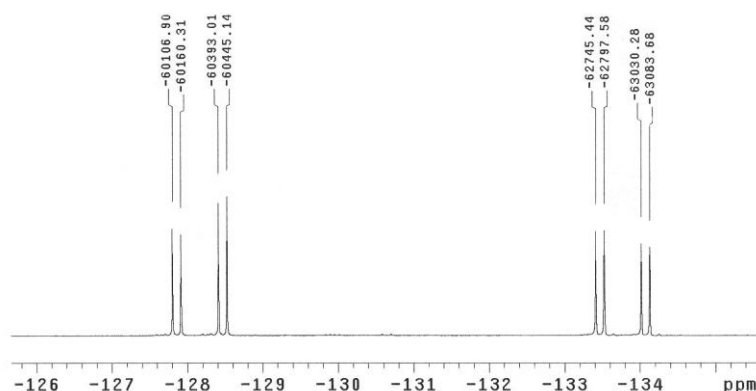
Rysunek 34. Schemat syntezy 2-difluorometylolizyny.

Synteza DFML polega na alkirowaniu enolanu, otrzymanego z pochodnej α -amino-kwasu. Substrat **37**, L-lizynę przeprowadziłam w jej ester metylowy **38** poprzez ogrzewanie z metanolem w obecności chlorkiem tionylu. Natomiast grupy aminowe przekształciłam w iminowe – tworząc zasady Schiffa w reakcji związku **38** z benzaldehydem. Otrzymałam 2,6-di(benzylidenoamino)heksanian metylu (**39**) jako gęsty, żółty olej z wydajnością 90%, porównywalną do literaturowej.

Kluczowym etapem było alkirowanie atomu α -węgla benzylidenoowej pochodnej **39** chlorodifluorometanem. W tym celu odszczepiałam α -proton od związku **39** za pomocą LDA generowanego *in situ*, z *n*-butylolitu i diizopropylaminy. Następnie tak utworzony karboanion alkirowałam gazowym freonem. Według Bey i in.¹⁰⁶ reakcja przebiega całkowicie, bo aż z 97% już po upływie 1h. Pomimo stosowania analogicznych warunków reakcji fluorometylowania, nie zaobserwowałam takiego przebiegu reakcji. Izolowałam natomiast mieszaninę dwóch związków: 2,6-dibenzylidenoamino-2-difluorometyloheksanianu metylu (**40**) oraz nieprzereagowanego substratu

39 w stosunku 1 : 2,6. Taki skład mieszaniny poreakcyjnej oszacowałam na podstawie obecności sygnałów charakterystycznych dla protonów metinowych obu substancji w widmie ^1H NMR wstępnie przerobionej mieszaniny poreakcyjnej. Wydłużanie czasu reakcji fluorometylowania enolanu do 3h, a nawet 5h z ciągłym przepływem freonu przez mieszaninę reakcyjną skutkowało zmianą stosunku produktu **40** do substratu **39** (od 1 : 2,6 poprzez 1 : 1 aż do 2,5 : 1). W przeciwieństwie do danych literaturowych, reakcja wymaga dłuższego czasu reakcji (minimum 5h) i prowadzi do mieszaniny substratu z produktem, który jest niestabilny podczas oczyszczania przez destylację lub chromatografię kolumnową.

Aby usunąć osłony benzyldenowe, nierozdzieloną mieszaninę poreakcyjną traktowałam 2*N* roztworem wodnym HCl w temperaturze pokojowej. Z mieszaniny, po zaszczepleniu, krystalizował dichlorowodorek estru metylowego α -difluorometylolizyny (**41**) w postaci białych kryształów o *tt* 193-194°C. Strukturę otrzymanego związku **41** potwierdziłam widmami ^1H i ^{13}C NMR. Obecność atomów fluoru sprawdziłam spektroskopią ^{19}F NMR, obserwując w widmie dwa dublety dubletów o stałych sprzężenia spinowo-spinowego $^2J_{\text{HF}} = 53\text{Hz}$ oraz $^2J_{\text{FF}} = 286\text{Hz}$ (rysunek 35). Zaszczepkę związku **41** otrzymałam poprzez rozdzielenie chromatografią kolumnową pochodnych *tert*-butoksykarbonylowych estrów metylowych lizyny oraz α -difluorometylolizyny, a następnie acydolityczne usunięcie grupy ochronnej.



Rysunek 35. Widmo ^{19}F NMR dla dichlorowodoru estru metylowego 2-difluorometylolizyny (rozp. CD_3OD).

Ostatnim etapem syntezy była hydroliza z katalizą kwasową estru metylowego pochodnej **41**. Po 4 dniach ogrzewania do temperatury 90°C roztworu estru **41** w 3,6*N* kwasie solnym, a następnie krystalizacji otrzymałam 2-difluorometylolizynę w postaci dichlorowodoru **42** o *tt* >240°C (r) z wydajnością 70%. Strukturę potwierdziłam protonowym, węglowym i fluorowym NMR.

Końcowy produkt syntezy – dichlorowodorek 2-difluorometylolizyny (**42**) oraz dichlorowodorek estru metylowego **41** zostały przekazane do badań biologicznych, gdzie zostały sprawdzone pod względem ich aktywności przeciwgrzybowej oraz zdolności inhibicyjnych w stosunku do enzymów szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego.

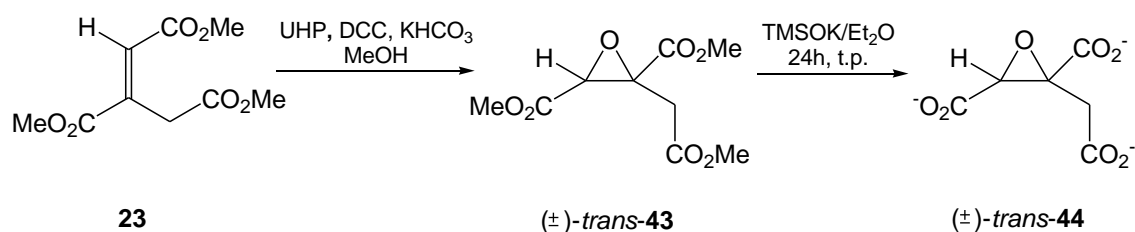
3.5. Kwasy 1,2-epoksy-1,2,3-propanotrikarboksylowe oraz 1,2-epoksy-1,2,4-butanotrikarboksylowe

Jednym z założeń mojej pracy doktorskiej było otrzymanie pochodnych epoksydowych kwasów alkanotrikarboksylowych. Epoksydy są ważnymi substancjami organicznymi, służącymi m. in. jako prekursorzy w syntezie związków naturalnych i substancji o charakterze potencjalnych leków.¹⁰⁷ Ze względu na obecność w cząsteczce pierścienia epoksydowego są to związki wysoce reaktywne i mogą oddziaływać między innymi z grupami hydroksylowymi, tiolowymi bądź aminowymi reszt aminokwasowych, wchodzących w skład struktury enzymu. Stąd substancje te mogą mieć również istotne znaczenie biologiczne jako potencjalne inhibitory szlaku kwasu cytrynowego oraz α -aminoadypinowego.

Synteza oksiranów różni się w zależności od rodzaju substratów, które wykorzystuje się do reakcji utleniania. Kwas akonitynowy zawiera w swojej strukturze wiązanie podwójne, które postanowiłam utleniać adaptując jedną z dwóch znanych metod. W jednej z nich źródłem tlenu jest nadtlenek wodoru, uwalniany *in situ* z kompleksu mocznik-H₂O₂ tzw. UHP (z ang. *uridine-hydrogen peroxide*).¹⁰⁸ Metoda ta posiada kilka zalet m.in. jest prowadzona w temperaturze pokojowej i w stosunkowo krótkim czasie (ok. 4h), a przebiega ze stosunkowo wysoką wydajnością powyżej 70%, ale związki posiadające podstawniki elektronoakceptorowe ulegają utlenianiu znacznie trudniej.

Zdecydowałam się wykorzystać w/w sposób utleniania wiązania podwójnego w estrze kwasu *trans*-akonitynowego **23**. Otrzymany przeze mnie *trans*-akonitynian trimetylu, w wyniku fluorowania cytrynianu trimetylu **21**, poddałam reakcji utleniania w obecności UHP, *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu i KHCO₃. Ze względu na higroskopijne właściwości, kompleks UHP przygotowałam bezpośrednio przed reakcją. Jest on znakomitym, występującym w stanie stałym zamiennikiem roztworu nadtlenu wodoru. Charakteryzuje się wysoką zawartością H₂O₂ w swojej cząsteczce i zdolnością

uwalniania go z kompleksu podczas reakcji utleniania w kontrolowany sposób.¹⁰⁹ Jako rozpuszczalnik zastosowałam bezwodny alkohol metylowy. Reakcja przebiegała w temperaturze pokojowej przez 24h. Otrzymałam surowy produkt, który oczyszczałam z użyciem chromatografii kolumnowej, w wyniku czego uzyskałam racemiczny epoksyd *trans*-**43**† w postaci gęstego, bezbarwnego oleju, ale z niską wydajnością 13%. Przyczyną takiej wydajności najprawdopodobniej była obecność elektronoakceptorowych grup estrowych. Poza tym metoda ta jest szybkim sposobem syntezy oksiranów w łagodnych warunkach, w których nie obserwowałam otwierania pierścienia epoksydowego. Strukturę związku potwierdziłam widmami ¹H NMR oraz ¹³C NMR (Część eksperymentalna, podrozdział 4.10.3). W literaturze patentowej,¹¹⁰ w której opisano ten związek, scharakteryzowano go jedynie w oparciu o analizę elementarną. Mankamentem stosowania metody z UHP jest powstawanie dużych ilości *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), który wypadł z mieszaniny poreakcyjnej. Schemat syntezy został zaprezentowany na Rysunku 36.

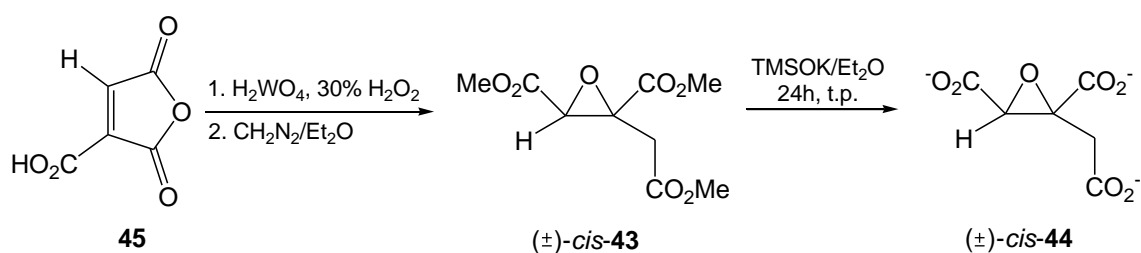


Rysunek 36. Synteza pochodnej epoksydowej kwasu *trans*-akonitynowego.

Omawiana synteza jest nową metodą otrzymywania racemicznej pochodnej epoksydowej kwasu *trans*-akonitynowego, opracowaną w oparciu o literaturę.¹⁰⁸ Związek *trans*-**43** przekształciłam następnie w jego sól tripotasową (*trans*-**44**), w reakcji z trimetylosilanolanem potasu (TMSOK) w bezwodnym eterze dietylowym, z wydajnością 87%. Podczas procesu rozszczepiania estrów metylowych trimetylosilanolanem potasu nie obserwowałam powstawania produktów otwierania pierścienia oksiranowego, czego należałoby się spodziewać w przypadku stosowania standardowych warunków hydrolizy zasadowej estrów.

† Ze względu na skomplikowane nazewnictwo systematyczne pochodnych epoksydowych kwasu akonitynowego i homoakonitynowego, w nazewnictwie zwyczajowym występują one z przedrostkami *cis*- lub *trans*-, które uwzględniają wzajemne położenie dwóch grup karboksylowych połączonych z atomami C2 i C3; w niniejszej pracy będę stosowała, podobnie jak dla kwasów akonitynowego i homoakonitynowego przedrostki *cis*- oraz *trans*- dla rozróżnienia dwóch stereoisomerów.

Kwas akonitynowy, ze względu na obecność wiązania podwójnego, występuje w postaci dwóch stereoisomerów *cis*- oraz *trans*. Trwalszą odmianą jest diastereoizomer *trans*. W warunkach naturalnych, z upływem czasu, izomer *cis* przechodzi samorzutnie w trwalszą postać *trans*. W celu uniknięcia przekształcania się stereoizomeru *cis*- w *trans*-, do syntezy pochodnej epoksydowej kwasu *cis*-akonitynowego, wykorzystałam jako substrat bezwodnik kwasu *cis*-akonitynowego, który nie ulega izomeryzacji. W tym przypadku zaadoptowałam drugą z metod tworzenia pierścieni oksiranowych przy użyciu roztworu wodnego nadtlenu wodoru jako źródła tlenu oraz katalizatora – kwasu wolframowego (H_2WO_4).¹¹⁰ Rysunek 37 przedstawia schemat otrzymywania racemicznej pochodnej epoksydowej kwasu *cis*-akonitynowego.



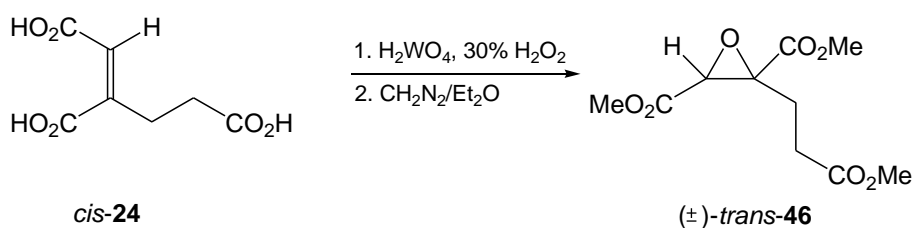
Rysunek 37. Synteza pochodnej epoksydowej kwasu *cis*-akonitynowego.

Bezwodnik kwasu *cis*-akonitynowego równocześnie ulegał reakcji utleniania i hydrolizy podczas rozpuszczania go w 30% wodzie utlenionej w obecności katalitycznej ilości kwasu wolframowego. Z uwagi na skłonność substratu do izomeryzacji, reakcję prowadzono w temperaturze do 40°C, a następnie izolowano produkt przy zastosowaniu ekstrakcji ciągłej ciec – ciec, w której ekstrahującym czynnikiem ciekłym był niskowrzący eter dietylowy (tw 35°C). W przeciwieństwie do oryginalnej metody patentowej zaproponowanej przez Guthrie’go,¹¹⁰ powstawała mieszanina trzech produktów: pochodnej epoksydowej kwasu *cis*-akonitynowego oraz kwasów *cis*- i *trans*-akonitynowych. Na podstawie widma ^1H NMR mieszaniny produktów stwierdziłam obecność wymienionych trzech związków w stosunku odpowiednio 2 : 1 : 1. Podany w patencie sposób izolacji pochodnej epoksydowej kwasu *cis*-akonitynowego, polegający na krystalizacji frakcyjnej z rozpuszczalników octan etylu – tetrachlorek węgla, również nie prowadził do czystego produktu, lecz do wspomnianej mieszaniny kwasów. Aby wyizolować produkt *cis*-44 musiałam rozdzielić mieszaninę wolnych kwasów. Dlatego postanowiłam przeprowadzić je w odpowiednie estry działaniem odczynnika metylującego – diazometanu. Jest to szybka i efektywna metoda estryfikacji kwasów karboksylowych. Uzyskane estry *cis*-43, *cis*-23 oraz *trans*-

23 rozdzieliłam przy użyciu chromatografii kolumnowej, otrzymując związek *cis*-**43** z wydajnością końcową 25%. Strukturę związku potwierdziłam widmami spektroskopii ^1H oraz ^{13}C NMR (Część eksperymentalna, podrozdział 4.10.1). W literaturze patentowej¹¹⁰ scharakteryzowano ten związek jedynie w oparciu o analizę elementarną.

Aby przekształcić ester **43** w pochodną epoksydową kwasu *cis*-akonitynowego, podobnie jak w przypadku izomeru *trans*, zastosowałam trimetylosilanolan potasu. Po rozszczepieniu estrów izolowałam epoksydową pochodną kwasu *cis*-akonitynowego (*cis*-**44**) w postaci soli tripotasowej z dobrą wydajnością 80%.

Dotychczasowy stan wiedzy na temat izomerycznych epoksydowych pochodnych kwasu akonitynowego wywodzi się z literatury patentowej.¹¹⁰ Natomiast analogiczne pochodne kwasu homocytrynowego nie są znane. Aby otrzymać ten nowy związek – pochodną epoksydową *trans*-homoakonitynianu trimetylu przetestowałam obie z wymienionych metod. Reakcja utleniania *cis*-homoakonitynian trimetylu przy użyciu kompleksu UHP niestety nie prowadziła do powstawania produktu – odzyskiwałam substrat w ilości wyjściowej. Zdecydowałam się na wariant wykorzystujący reakcję utleniania 30% wodą utlenioną w obecności kwasu wolframowego i kwasu *cis*-homoakonitynowego (Rysunek 38).



Rysunek 38. Synteza epoksydu *trans*-homoakonitynianu trimetylu.

Reakcję prowadziłam w podwyższonej temperaturze (ok. 80°C). Po zobojętnieniu kwasem solnym, mieszaninę reakcyjną ekstrahowałam eterem dietylowym stosując technikę ekstrakcji ciągłej w układzie ciecz – ciecz. Produkt **46** izolowałam analogicznie jak pochodną epoksydową kwasu *cis*-akonitynowego – przeprowadziłam metylowanie i oczyszczanie z zastosowaniem chromatografii kolumnowej. Prawdopodobnie zbyt wysoka temperatura reakcji spowodowała, że zamiast produktu *cis*-, otrzymałam produkt *trans*-**46** z wydajnością 33,5%. Strukturę pochodnej epoksydowej **46** potwierdziłam widmami spektroskopii ^1H oraz ^{13}C NMR.

Wszystkie pochodne epoksydowe, zarówno kwasu akonitynowego, jak i homoakonitynowego zostały przebadane biologiczne w Katedrze Technologii Leków i

Biochemii. Oznaczono ich aktywność przeciwgrzybowa wobec kilku szczepów grzybowych: *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* oraz *C. krusei* oraz zdolność hamowania enzymów szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego biosyntezy *L*-lizyny.

3.6. Właściwości biologiczne otrzymanych związków

3.6.1. Aktywność przeciwgrzybowej zsyntezowanych związków

Wszystkie otrzymane związki, w postaci estrów metylowych, zostały zbadane pod względem aktywności przeciwgrzybowej wobec sześciu referencyjnych szczepów grzybowych: *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* oraz *C. krusei*. W tym celu określono minimalne stężenia hamujące wzrost drobnoustrojów grzybowych (MIC) w różnych podłożach biologicznych (Tabela 4).

Badany związek	MIC [$\mu\text{g/ml}$]					
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. krusei</i>
<i>L</i> -14	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
22	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
25	> 512	> 512	> 512	> 512	256	> 512
26	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
<i>L</i> -33	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
35	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
41	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
(\pm)- <i>cis</i> -43	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
(\pm)- <i>trans</i> -43	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
(\pm)- <i>trans</i> -46	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512
47	> 512	> 512	= 512	256	256	> 512

Tabela 4. Wyniki oznaczania aktywności przeciwgrzybowej otrzymanych związków w podłożu YNB.

Z badań wynika, że większość z uzyskanych związków nie wykazuje aktywności przeciwgrzybowej w stosunku do wspomnianych szczepów grzybowych. Jedynie pochodne **25** czyli (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-allylobursztynian dimetylu oraz **47** - (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-butylobursztynian dimetylu charakteryzowały się nieznaczną aktywnością

przeciwwgrzybową w stosunku do szczepu *Candida lusitaniae*, a związek **47** również do *Candida tropicalis*.

Obiecującą aktywnością przeciwwgrzybową cechował się natomiast *trans*-homoakonitynian trimetylu (*trans*-**24**). Wyznaczanie wartości MIC dla tego związku, po stwierdzeniu jego aktywności w podłożu YNB, przeprowadzono także w podłożu YNB buforowanym do pH 7,0 oraz w dwóch innych podłożach: YEPG oraz RPMI (z dodatkiem i bez dodatku lizyny). Wyniki uzyskane dla pochodnej *trans*-**24** przedstawiono w Tabeli 5.

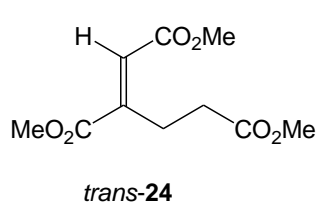
 <i>trans</i> - 24	Szczep	Rodzaj pożywki				
		YNB	YNB pH = 7,0	YEPG	RPMI	RPMI z lizyną
		MIC [µg/ml]				
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	256	256	512	32	32
	<i>Candida glabrata</i>	256	128	256	16	32
	<i>Candida albicans</i>	256	128	256	16	32
	<i>Candida tropicalis</i>	128	64	128	32	16
	<i>Candida lusitaniae</i>	128	128	256	16	32
	<i>Candida krusei</i>	128	128	256	32	32

Tabela 5. Aktywność przeciwwgrzybowa *trans*-homoakonitynianu trimetylu w różnych podłożach.

Związek *trans*-**24** hamował wzrost wszystkich badanych szczepów we wszystkich rodzajach podłoży. Najwyższą aktywność przeciwwgrzybową stwierdzono w pożywce RPMI z dodatkiem i bez dodatku lizyny. Ten rodzaj medium biologicznego najlepiej odzwierciedla warunki panujące w organizmie ludzkim, tak więc uzyskane wyniki należy uznać za obiecujące. Stosunkowo zaskakujące jest, że obecność *L*-lizyny w podłożu nie powoduje odwrócenia efektu zahamowania wzrostu wywołanego działaniem *trans*-**24**. Może to oznaczać, że cel molekularny tego związku w komórce grzybowej jest inny, niż enzymy szlaku biosyntezy *L*-lizyny. Aby zweryfikować tę hipotezę, konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań biochemicznych.

3.6.2. Oznaczenie stopnia hamowania aktywności enzymów przez badane związki

Wszystkie otrzymane związki, w postaci soli potasowych bądź w postaci chlorowodoru, w przypadku difluorometylolizyny (**42**) przebadano pod względem zdolności inhibicyjnych wobec dwóch enzymów szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego: syntazy homocytrynianowej występującej w dwóch izoformach Lys21-N-Hisp i Lys22-N-Hisp oraz dehydrogenazy homoizocytrynianowej. Wyniki zostały zaprezentowane w Tabeli 6.

Badany związek	Enzym		
	Syntaza homocytrynianowa Lys21-N-Hisp*	Syntaza homocytrynianowa Lys22-N-Hisp*	Dehydrogenaza homoizocytrynianowa (% inhibicji przy 5mM stężeniu związku)
31	brak inhibicji	brak inhibicji	36,8±3,5
32	IC ₁₀ = 2,5mM	IC ₂₀ = 4,2mM	15,1±3,5
34	brak inhibicji**	brak inhibicji	35,7±3,5
36	brak inhibicji	brak inhibicji	20,1±3,5
42	brak inhibicji	IC ₄₀ = 4,8mM	brak inhibicji
(±)- <i>cis</i> - 44	brak inhibicji	brak inhibicji	37,6±3,5
(±)- <i>trans</i> - 44	brak inhibicji	brak inhibicji	25,9±3,5
49	brak inhibicji	brak inhibicji	15,5±3,5

Tabela 6. Inhibicja aktywności enzymów dla badanych związków;

* w *C. albicans* występują dwie izoformy tego enzymu; ** brak inhibicji – oznacza brak efektu hamowania aktywności poniżej stężenia związku 10mM; IC_x – oznacza stężenie, przy którym następuje x% hamowania aktywności enzymu.

Większość szlaków biosyntezy aminokwasów jest regulowana na pierwszym etapie przez końcowy produkt, na zasadzie tzw. sprzężenia zwrotnego. Z przeprowadzonych badań wynika, że pochodna fluorowa DFML - dichlorowodorek α -difluorometylolizyny (**42**), ze względu na podobieństwo strukturalne do *L*-lizyny, końcowego produktu szlaku kwasu *L*- α -aminoadypinowego, powoduje zahamowanie aktywności drugiej izoformy syntazy homocytrynianowej Lys22-N-Hisp z *C. albicans* w 40% przy stężeniu 4,8mM. Zaskakujące jest jednak, że nie hamuje przy tym jego pierwszej izoformy – Lys21-N-Hisp. Wg K. Kur,¹¹⁷ obydwie izoenzymy HCS są silnie hamowane przez *L*-lizynę, jednakże izoenzym Lys22-N-Hisp jest znacznie bardziej podatny na działanie tego

inhibitora. Zatem powyższe wyniki potwierdzają, że związek **42**, będąc analogiem strukturalnym lizyny, bardziej hamuje aktywność drugiej formy izoenzymu Lys22-N-Hisp.

Analogi strukturalne kwasu homoizocytrynowego - substratu dehydrogenazy homoizocytrynianowej tj. (2*S*,3*R*)-3-allilobjęczan dipotasowy (**31**) oraz (2*S*,3*R*)-3-propylobęczan dipotasowy (**34**) hamują aktywność tego enzymu odpowiednio w 37% i 36% przy stężeniu 5mM badanych związków. Nieco mniejszy stopień inhibicji, w granicach 15-20%, wykazują fluorowane pochodne: (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-allilobursztynian dipotasowy (**32**) i (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-propylobursztynian dipotasowy (**36**). Ponadto związek **32** hamuje również aktywność obu izoenzymów syntazy homocytrynianowej, na co wskazuje wartość $IC_{10} = 2,5mM$ dla Lys21-N-Hisp oraz $IC_{20} = 4,2mM$ dla Lys22-N-Hisp. Związek ten okazuje się być ciekawym, ze względu na fakt, że również jego postać estrowa **25** wykazywała aktywność przeciwgrzybową wobec szczepu grzybowego *C. lusitaniae*.

Pod względem inhibicji zbadano także epoksyd *cis*- i *trans*-akonitynianu tripotasowego oraz *trans*-homoakonitynian tripotasowy (**49**). Zarówno związek *cis*-**44**, jak i *trans*-**44** powodowały zahamowanie aktywności dehydrogenazy homoizocytrynianowej, odpowiednio w 38% i 26%. Natomiast związek **49** przejawiał zaledwie 15,5% stopień inhibicji do tego enzymu, pomimo, że jego forma estrowa *trans*-**24** przejawiała znakomite właściwości grzybobójcze wobec wszystkich badanych szczepów grzybowych.

Dalsze badania dotyczące określenia aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków w stosunku do homoakonitazy oraz oznaczenia cytotoksyczności są w trakcie realizacji przez dr inż. Iwonę Gabriel z Katedry Technologii Leków i Biochemii na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej.

4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

4.1 Metody analityczne i warunki przygotowania niektórych odczynników do syntez

4.1.1 Informacje ogólne

Temperatury topnienia otrzymanych związków nie były korygowane. Pomiar skracalności zostały wykonane na polarymetrze Rudolph Autopol II przy długości fali 589nm.

Widma NMR zostały zmierzone na aparatach Gemini Varian i Unity Plus pracujących odpowiednio dla protonów (^1H NMR) przy 200 i 500 MHz; dla ^{13}C NMR – 50 MHz i 125 MHz, natomiast dla ^{19}F NMR przy częstotliwości 470 MHz; jako wzorzec wewnętrzny stosowano tetrametylosilan. Widma IR zmierzono przy użyciu aparatu FT-IR Bruker IFS 66. Analizę MS-ESI wykonano na spektrometrze MALDI-TOF Bruker BiFlex III.

Do chromatografii kolumnowej (CC) stosowano żel krzemionkowy firmy Merck o średnicy ziaren 70-230mesh (0,063-0,200mm), kationit DOWEX [H^+] 50W \times 2-100mesh, natomiast do chromatografii kolumnowej typu flash (FCC) używano żel krzemionkowy firmy Merck o średnicy ziaren 230-400mesh (0,040-0,063mm).

Ekstrakcję do fazy stałej tzw. SPE (*solid phase extraction*) prowadzono stosując kolumny polietylenowe wypełnione żelem krzemionkowym typu CHROMABOND[®] SiOH 15ml/2000mg firmy Macherey-Nagel.

Do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) używano płytek aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym Silica gel 60 lub Silica gel 60 F₂₅₄ firmy Merck o grubości 0,2mm.

Stosowane układy rozwijające to:

- układ A – chloroform : metanol : kwas octowy (85 : 10 : 5);
- układ B – benzen : octan etylu : etanol (85 : 20 : 5);
- układ C – benzen : octan etylu : etanol (60 : 20 : 5);
- układ D – benzen : octan etylu : etanol (85 : 7,5 : 1,5);
- układ E – *n*-butanol : kwas octowy : woda (4 : 1 : 1);
- układ F – heksan : octan etylu (9 : 5);
- układ G – heksan : octan etylu : metanol (14 : 6 : 0,2).

Skład układów rozwijających podano w stosunku objętościowym.

Jako odczynnika wywołującego używano par jodu w temperaturze pokojowej, odczynnika cerowo-molibdenowego lub dla związków z wolną grupą aminową roztwór ninhydryny.

4.1.2 Warunki analizy HPLC

Analizy chromatograficzne zostały wykonane z wykorzystaniem zestawu do wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) Agilent 1200 Series (USA) sprzężony z detektorem z matrycą fotodiodową (DAD) i zaopatrzony w kolektor frakcji. Sprzęt jest wyposażeniem laboratorium badawczego Centrum Doskonałości „ChemBioFarm”, którego zakup został częściowo sfinansowany z funduszy strukturalnych Unii Europejskiej w ramach Sektorowego Programu Operacyjnego – Wzrost Konkurencyjności Przedsiębiorstw. Aparat współpracuje z oprogramowaniem komputerowym Agilent ChemStation Software – systemem analizy danych chromatograficznych.

Aparat składał się z:

- pompy czterodrożnej;
- uniwersalnego interfejsu;
- odgazowywacza;
- kolumny analitycznej bądź preparatywnej;
- kolektora frakcji;
- termostatu;
- autosamplera;
- detektora z matrycą fotodiodową (DAD).

Rozpuszczalniki stosowane do wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC)

- metanol, czysty do HPLC (Merck)
- acetonitryl, czysty do HPLC (Merck)
- woda MiliQ do HPLC

4.1.3. Odczynniki pomocnicze stosowane w syntezie

N-nitrozo-N-metylomocznik

N-Nitrozo-N-metylomocznik o t_f 124(r)°C otrzymano z wydajnością 80% zgodnie z procedurą zamieszczoną w lit.¹¹¹

Diazometan

Uwaga: Ze względu na bardzo wysoką toksyczność diazometanu, wszystkie prace z tym odczynnikiem należy prowadzić pod sprawnie działającym dygestorium.

Do kolby Erlenmeyera, zawierającej 100ml 40% roztworu wodorotlenku potasowego oraz 60ml eteru dietylowego, ochłodzonych do temperatury -20°C , dodaje się małymi porcjami (10.3g, 0.1mola) *N*-nitrozo-*N*-metylomocznika, ciągle wstrząsając. Temperatura mieszaniny nie powinna przekroczyć $+5^{\circ}\text{C}$. Po 10min od chwili zakończenia dodawania *N*-nitrozo-*N*-metylomocznika oddziela się roztwór eterowy diazometanu, a warstwę zasadową ekstrahuje się jeszcze $2 \times 70\text{ml Et}_2\text{O}$. Frakcje eterowe diazometanu łączy się i suszy 3h małą ilością stałego wodorotlenku potasowego w temperaturze 0°C .⁷⁷

Brom suchy

Brom suszono nad P_2O_5 przez 24h. Następnie przesączano go przez watę szklaną i używano bezpośrednio do reakcji bromowania.

Tetrahydrofuran bezwodny do reakcji z LDA

Przed przystąpieniem do destylacji tetrahydrofuranu, należy usunąć nadtlenki, przepuszczając rozpuszczalnik przez kolumnę wypełnioną tlenkiem glinu, bądź wytrząsając go ze stężonym roztworem siarczanu żelaza (II). Po usunięciu nadtlenków, w kolbie kulistej o pojemności 2000ml, zaopatrzonej w chłodnicę zabezpieczoną rurką z CaCl_2 przed dostępem wilgoci, umieszczono 1500ml THF, po czym dodano 8g stopu K/Na (3:1). Mieszaninę ogrzewano do wrzenia przez 2h. Następnie chłodnicę zwrótną wymieniono na destylacyjną zabezpieczoną przed wilgocią i zbierano THF. Do reakcji należy używać THF świeżo destylowany z nad stopu Na/K.

N,N-Dimetyloformamid bezwodny (tw 153°C)

Handlowy odczynnik lub przechowywany przez dłuższy okres zawiera dimetyloaminę, aldehyd mrówkowy i wodę.

500ml DMF z dodatkiem 50ml benzenu i 25ml wody poddaje się destylacji kolumnowej, aż destylat osiągnie temperaturę 152°C . Dalszą destylację prowadzi się pod zmniejszonym ciśnieniem, zabezpieczając aparaturę przed wilgocią. Czysty,

bezwodny DMF o tw 76-77°C/40 mm Hg należy przechowywać w ciemnych, szczelnych butelkach.

Dichlorometan bezwodny (tw 40°C)

1500ml CH₂Cl₂ z dodatkiem 50g P₂O₅ i 50g bezwodnego K₂CO₃ ogrzewano przez 2h pod chłodnicą zwrotną. Po tym czasie zmieniono chłodnicę na destylacyjną, zakładając rurkę ze środkiem suszącym. Zbierano suchy dichlorometan o tw 40°C i przechowywano go w ciemnej, szczelnej butelce.

UHP

W dwuszyjnej kolbie kulistej o pojemności 100ml, zaopatrzonej w termometr i chłodnicę zwrotną, umieszczono 12g mocznika i 34ml nadtlenu wodoru (30%). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 60°C przez 10min, następnie ochłodzono i wylano do kilku krystalizatorów do powolnego odparowania i wykryszalowania.¹¹²

Chlorodifluorometan

Stosowano dostępny komercyjnie, firmy ABCR GmbH&Co. KG, Karlsruhe.

Odczynniki wywołujące:

1. Odczynnik cerowo-molibdenowy:

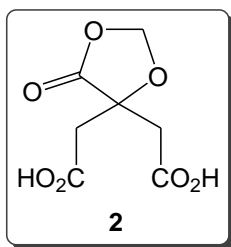
- 3,74g NaMoO₄×2H₂O
- 1,215g Ce(SO₄)₂×4 H₂O
- 6,27ml H₂SO₄ (95-96%)
- 83,5ml H₂O

2. Odczynnik ninhydrynowy (dla związków z wolną grupą aminową):

- 800mg ninhydryny
- 400ml MeOH
- 80ml AcOH
- 4ml kolidyny

4.2. Synteza optycznie czynnego kwasu homocytrynowego

4.2.1. Kwas metylenocytrynowy



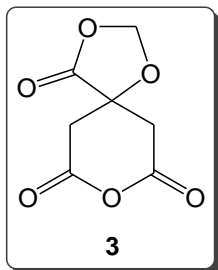
Metoda I:

W kolbie kulistej o pojemności 500ml, z nasadką do azeotropowego odprowadzania wody, umieszczono kwas cytrynowy (**1**) (63g; 0,3mola), paraformaldehyd (12g, 0,39mola), kwas *p*-toluenosulfonowy (0,3g) i ogrzewano z 300ml toluenu przez 2 doby. Powstającą w reakcji wodę, wraz z nieprzereagowanym paraformaldehydem, zbierano w nasadce azeotropowej. Następnie z mieszaniny reakcyjnej oddestylowano toluen pod zmniejszonym ciśnieniem. Powstały surowy produkt krystalizowano z wody, otrzymując 33,5g (55%) kwasu metylenocytrynowego (**2**) w postaci kremowych kryształów o *tt* 202-204°C [lit.¹¹³ *tt* 205°C].

Metoda 2: wg przepisu podanego przez Sternberga¹¹³

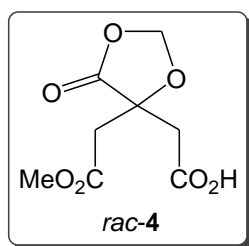
W dwuszyjnej kolbie kulistej zaopatrzonej w termometr i chłodnicę zwrotną, stapiano kwas cytrynowy (100g; 0,48mola) z paraformaldehydem (15g, 0,5mola) w temperaturze 140-160°C. Po całkowitym stopieniu obu substancji, roztwór ogrzewano do zestalenia się mieszaniny reakcyjnej. Tak uzyskany surowy produkt, krystalizowano bezpośrednio z gorącej wody. Otrzymano 51,2g (52%) kwasu metylenocytrynowego (**2**), w postaci białych kryształów o *tt* 200,5-202,5°C [lit.¹¹³ *tt* 205°C].

4.2.2. Bezwodnik kwasu metylenocytrynowego



Kwas metylenocytrynowy (30g; 0,15mola) zawieszono w 60ml chloroformu, dodawano *N,N*-dimetyloanilinę (37,2ml; 0,34mola) i mieszano do rozpuszczenia substancji. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano tlenochlorku fosforu (V) (13,5ml; 0,15mola) i całość ogrzewano przez ok. 0,5h. Powstałą ciemnobrązową substancję z opalizującymi kryształkami ostudzono i pozostawiono przez noc w lodówce, do całkowitego wykryształowania produktu. Po odsączeniu kryształów przemyto je zimnym chloroformem i wysuszono. Otrzymano 26,3g surowego produktu, który krystalizowano z octanu etylu, uzyskując 24,3g (87%) białego, krystalicznego bezwodnika kwasu metylenocytrynowego (**3**) o *tt* 152-155°C [lit.⁷³ *tt* 153°C].

4.2.3. Wodorometylenocytrynian metylu¹¹⁴

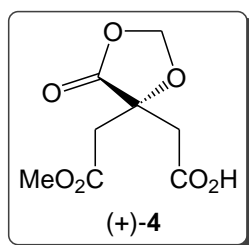


Bezwodnik kwasu metylenocytrynowego (10g; 0,05mola) ogrzewano z 300ml bezwodnego metanolu do całkowitego rozpuszczenia substancji, a następnie przedłużono ogrzewanie o dalsze 0,5h. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono i oddestylowano rozpuszczalnik. Pozostałość rozpuszczono w 150ml wody i ekstrahowano eterem dietylowym (4×80ml). Frakcje eterowe połączono i suszono nad bezwodnym MgSO₄. Po krystalizacji z wody otrzymano 7,73g (66%) białego, krystalicznego monoestru metylowego kwasu metylenocytrynowego (*rac*-**4**) o tt 124-126°C [lit.⁶⁰ 126-127°C], R_f = 0,70 (układ A).

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 2,91 (*s*, 2H, CH₂); 2,96 (*s*, 2H, CH₂); 3,72 (*s*, 3H, OCH₃); 5,57 (*s*, 2H, OCH₂O);

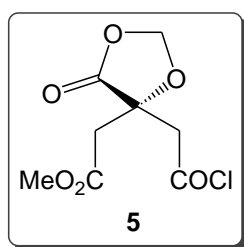
¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 41,24; 41,43; 52,77; 75,75; 95,53; 169,34; 173,18; 173,74.

4.2.4. Optycznie czynny wodorometylenocytrynian metylu



Racemiczny monoester metylowy kwasu metylenocytrynowego (8,1g; 37mmoli) rozpuszczono na gorąco w bezwodnym metanolu. Następnie do roztworu wkroplono (*S*)-(-)-1-fenyletyloaminę (4,78ml; 37mmoli). Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, do mieszaniny reakcyjnej dodawano małymi porcjami bezwodny eter dietylowy (55ml). Otrzymano białe kryształy soli (3,6g) o [α]_D+7 (*c*1; CHCl₃) i tt 136-138°C. Sól rozpuszczono w 0,5*N* HCl i ekstrahowano eterem dietylowym (5×35ml). Połączone roztwory eterowe przemywano małą ilością H₂O, suszono nad bezwodnym MgSO₄ i usunięto rozpuszczalnik pod próżnią. Otrzymano związek (+)-**4** jako bezbarwny olej, [α]_D+8.9 (*c*4,48; MeOH) [lit.¹¹⁵ *ee* 90-92 [α]_D²⁰+8.4 (*c*2,46; MeOH)].

4.2.5. Chlorek monoestru metylowego kwasu metylenocytrynowego



Metoda I:

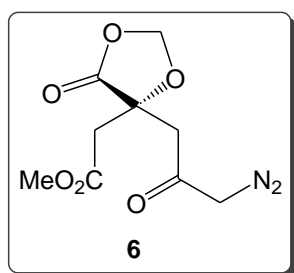
Do optycznie czynnego związku (+)-**4** (3,6g; 16mmoli) dodano chlorku oksalilu (10ml) i pozostawiono w zamkniętej kolbie pod wyciągiem na 3 dni. Po tym czasie, z mieszaniny reakcyjnej usunięto pod próżnią nieprzereagowany chlorek oksalilu, a

pozostałość 'przegoniono' kilkakrotnie heksanem. Otrzymano 3,8g (16mmoli) produktu **5** w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 100%.

Metoda II:

Do wodorometylenocytrynianu metylu **4** (2g; 9,17mmoli), ochłodzonego w łaźni lodowej, wkroplono SOCl_2 (0,67ml; 9,17mmoli), a następnie ogrzewano przez 1h pod chłodnicą zwrotną z zabezpieczeniem przed dostępem wilgoci. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono, dodano 10ml tetrachlorku węgla i oddestylowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Czynność tą powtórzono dwukrotnie. Otrzymano 2g (8,5mmola) produktu **5** w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 93%.

4.2.6. Diazoketon



Do chlorku **5** (3,8g; 0,016mola) dodawano porcjami (10-20ml) roztwór eterowy diazometanu (Materiały i metody, rozdział 4.1.1) do momentu, aż mieszanina reakcyjna przestała się odbarwiać i pozostawał widoczny żółty kolor. Reakcję prowadzono w atmosferze gazu obojętnego (argon). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej i w atmosferze gazu obojętnego przez noc, z jednoczesnym mieszaniem. Postęp reakcji śledzono chromatograficznie. Po upływie doby, do mieszaniny reakcyjnej dodano 1-2 krople kwasu octowego celem rozłożenia nieprzereagowanego diazometanu. Następnie na wyparce obrotowej oddestylowano rozpuszczalnik. Powstały surowy produkt, rozpuszczono w 30ml octanu etylu i przemyto nasyconym roztworem NaHCO_3 . Warstwę węglanową ekstrahowano octanem etylu (3×30ml). Frakcje organiczne połączono i przemywano kolejno porcjami po 40ml: wodą, 0,5N HCl, wodą i solanką. Fazę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO_4 , usunięto rozpuszczalnik. Pozostałość oczyszczano przy użyciu flash chromatografii na żelu krzemionkowym (< 200mesh). Eluentem był octan etylu. Otrzymano żółty olej związku (-)-**6** (3,7g; 95%) $[\alpha]_D -3,7$ (c4,1; MeOH); $R_f = 0,36$ (układ B). Racemiczny diazoketon izolowano przy użyciu flash chromatografii jako żółty olej z wydajnością 74%. Związek jest bardzo labilny, rozpada się po ogrzaniu.

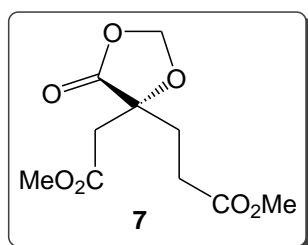
Diazoketon - aktywacja poprzez mieszany bezwodnik

Roztwór monoestru metylowego kwasu metylenocytrynowego (**4**) (500mg; 2,3mmola) w 10ml tetrahydrofuru ochłodzono do temperatury -10°C na łaźni lodowej

(mieszanka lodu z NaCl). Następnie do roztworu wkroplono chloromrówczan izobutyli (0,36ml; 2,7mmola) oraz *N*-metylomorfolinę (0,31ml; 2,7mmola) – tworzy się biała zawiesina, którą mieszano przez 3-4h w temperaturze -5°C. Po tym czasie, do mieszaniny reakcyjnej wkroplono 90ml świeżo przygotowanego roztworu diazometanu w eterze dietylowym, do momentu ustalenia się jaskrawo żółtej barwy. Reakcja przebiegała w atmosferze gazu obojętnego (argon) przez 12h w temperaturze pokojowej. Dalsze postępowanie było analogiczne do opisanego powyżej, z tym, że zamiast AcOEt jako rozpuszczalnika użyto eteru dietylowego. Otrzymano surowy produkt, który oczyszczono przy pomocy flash chromatografii na żelu krzemionkowym (< 200mesh). Jako eluent stosowano octan etylu. Uzyskano 170mg (30,5%) diazoketonu (**6**).

Zastąpienie *N*-metylomorfoliny trietyloaminą i prowadzenie reakcji w analogiczny sposób jak powyżej, prowadziło do izolowania diazoketonu z wydajnością 11%.

4.2.7. Metylenohomocytrynian dimetylu



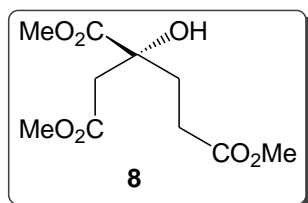
Diazoketon (**6**) (3,37g; 0,015mola) zawieszono w 190ml metanolu i mieszano w temperaturze pokojowej przez ok. 0,5h aż do całkowitego rozpuszczenia. Następnie do roztworu dodano tlenku srebra I (8,75g; 0,038mola), a mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 72h w temperaturze pokojowej z jednoczesnym mieszaniem. Reakcję prowadzono bez dostępu światła. Po tym czasie, z mieszaniny reakcyjnej oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 60ml AcOEt, przesączono przez filtr milipore w celu usunięcia związków srebra i przesącz przemywano kolejno porcjami po 20ml: wodą, 0,1N HCl, wodą, 5% roztworem NaHCO₃ i wodą. Frakcję organiczną suszono nad bezwodnym MgSO₄ i odparowano pod próżnią rozpuszczalnik. Otrzymano 2,6g surowego produktu, który oczyszczano przez krystalizację z mieszaniny rozpuszczalników toluen/heksan. Uzyskano diester metylowy kwasu metylenohomocytrynowego (**7**) (2,5g; 70%) w postaci żółtego gęstego oleju o $[\alpha]_D^{20} -40,7$ (c 2,7; MeOH), $R_f = 0,63$ (układ B).

MS (MALDI-TOF, matryca CCA): m/z 247,2 [M+1]; obl. dla C₁₀H₁₄O₇ 246,21.

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 2,15 (*t*, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$); 2,44 (*m*, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 2,90 (AB, $J = 17,1\text{Hz}$, 2H, CH_2CO); 3,70 (*s*, 3H, OCH_3); 3,72 (*s*, 3H, OCH_3); 5,50 (*s*, 1H, OCH_2O); 5,55 (*s*, 1H, OCH_2O);

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 28,48; 32,23; 40,78; 52,19; 52,48; 77,61; 94,83; 169,82; 172,74; 173,51.

4.2.8. Homocytrynian trimetylu



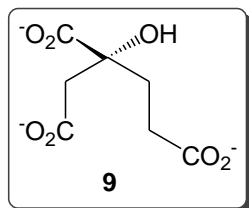
Metylenohomocytrynian dimetylu (285,3mg; 1,16mmola) rozpuszczono w 20ml bezwodnego metanolu. Do roztworu dodano trietyloaminę (0,16ml; 1,16mmola) i całość ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 10h. Postęp reakcji śledzono przy użyciu TLC. Po 10h oddestylowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej, pozostałość rozpuszczono w 10ml chloroformu, a organiczny roztwór przemywano kolejno porcjami po 2ml: wodą, 5% roztworem KHSO_4 i wodą. Fazę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO_4 , przesączono i usunięto rozpuszczalnik. Uzyskany olej oczyszczano przy użyciu flash chromatografii (eluent: CHCl_3). Otrzymano triester (*R*)-**8** jako żółty olej (200mg; 70%) o $[\alpha]_D -10,26$ (*c* 0,78; CHCl_3); $[\alpha]_D -6,5$ (*c* 1,23; MeOH); $R_f = 0,49$ (układ B) [lit.⁵² $[\alpha]_D -10,2$ (*c* 1,46; CHCl_3)].

MS (MALDI-TOF, matryca CCA): m/z 249,2 $[\text{M}+1]$; obl. dla $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_7$ 248,23

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 2,05 (*m*, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$); 2,27-2,31 (*m*, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$); 2,43-2,63 (*m*, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$); 2,73 i 2,92 (AB, $J=16,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,67 (*s*, 3H, OCH_3); 3,68 (*s*, 3H, OCH_3); 3,81 (*s*, 3H, OCH_3);

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 28,58; 34,32; 43,74; 52,23; 52,38; 53,54; 74,77; 171,47; 173,74; 175,48.

4.2.9. Homocytrynian trisodowy

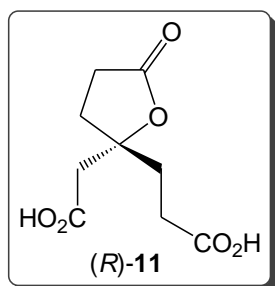


Do roztworu triestru metylowego kwasu homocytrynowego **8** (160,8mg; 0,65mmola) w 1,95ml metanolu, dodano 1,95ml 1M NaOH. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 2h. Po zakończeniu reakcji, oddestylowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a powstały osad osuszano przez kilkukrotne rozpuszczanie w bezwodnym metanolu i oddestylowywanie; procedurę powtórzono z bezwodnym

eterem dietylowym. Otrzymano biały, bezpostaciowy kwas homocytrynowy (**9**), w postaci soli trisodowej (170mg; 96%) o $[\alpha]_D -4,8$ (c 1,7; H₂O), $R_f = 0,16$ (układ E).

MS (MALDI-TOF, matryca CCA): m/z 273,05 [M+1]; obl. dla C₇H₇O₇Na₃ 272,09.

4.2.10. Lakton kwasu homocytrynowego



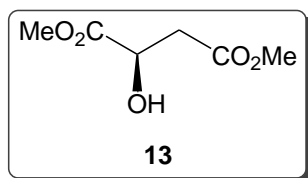
Metylenohomocytrynian dimetylu (**7**) (736mg; 3mmole) rozpuszczono w 20ml 50% tetrahydrofuranu i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 24h. Następnie z mieszaniny reakcyjnej oddestylowano kwas pod zmniejszonym ciśnieniem i 'przezoniono' kilkakrotnie eterem dietylowym. Otrzymano 730mg surowego produktu, który oczyszczano przez krystalizację z octanu etylu. Uzyskano lakton kwasu homocytrynowego (**R-11**), w postaci białych kryształów (496mg; 88%) o t_f 161,5-163,5°C [lit.⁵³ 161-163°C], $[\alpha]_D^{20} -52,9$ (c 1,04; H₂O) [lit.⁶³ $[\alpha]_D^{20} -57$ (c1 H₂O); lit.⁵³ $[\alpha]_D^{20} -50,88$ (c1; H₂O)]; $R_f = 0,31$ (układ C).

¹H NMR (*d*₆-aceton) δ [ppm]: 2,0–2,7 (m, 4H); 3,0 (*d*, $J = 16$ Hz, 1H); 3,15 (*d*, $J = 16$ Hz, 1H);

¹³C NMR (*d*₆-aceton) δ [ppm]: 28,32; 31,92; 41,74; 83,51; 170,47; 172,5; 176,48.

4.3. Synteza kwasu (2*R*,3*S*)-homoizocytrynowego

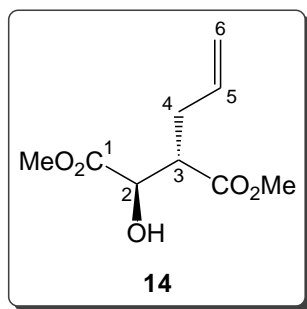
4.3.1. *D*-Jabłczan dimetylu



Do zawiesiny (2,9g; 21mmoli) kwasu *D*-jabłkowego (**12**) w 20ml eteru dietylowego, umieszczonej w kolbie okrągłodennej, zaopatrzonej w balonik z argonem, wkraplano strzykawką przez septum zimny roztwór diazometanu w eterze dietylowym do momentu aż mieszanina przestanie się odbarwiać. Mieszaninę reakcyjną mieszano w atmosferze argonu przez noc. Następnie oddestylowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej, otrzymując *D*-jabłczan dimetylu (**13**) (3,38g; 100%), w postaci gęstego, ciemno żółtego oleju o $R_f = 0,41$ (układ B).

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 2,85 (AB, $J = 16,1$ Hz, 2H, CH₂); 3,73 (*s*, 3H, OCH₃); 3,83 (*s*, 3H, OCH₃); 4,53 (*dd*, $J = 5,9$ Hz, $J = 5,9$ Hz, 1H, CH-OH).

4.3.2. (2*R*,3*S*)- 3-Allilo-2-hydroksybursztynian dimetylu

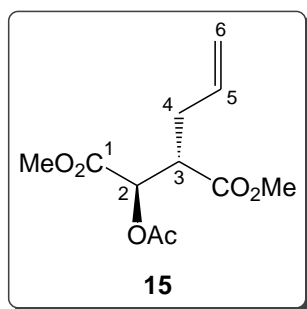


Do roztworu 38ml bezwodnego THF i DIPA (8,8ml; 62,6mmoli), ochłodzonego do -78°C , wkroplono strzykawką *n*-BuLi (2,5*M* roztwór w heksanie, 20,8ml, 52,2mmoli) i mieszano w atmosferze gazu obojętnego przez 1h, utrzymując w/w temperaturę. Następnie mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temp. 0°C , mieszano przez 10 min i ponownie ochłodzono do -78°C . Do tak schłodzonej mieszaniny reakcyjnej wkroplono roztwór *D*-jabłczanu dimetylu (3,38g; 20,86mmoli) w 6ml bezwodnego THF. Mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury $-23^{\circ}\text{C} \div -25^{\circ}\text{C}$ i mieszano w niej przez 1h. Po tym czasie, mieszaninę reakcyjną ponownie schłodzono do -78°C i wkroplono bromek allilu (4,57ml; 52,8mmoli). Otrzymany roztwór mieszano przez 2h w temperaturze -25°C , a następnie pozostawiono na noc w lodówce. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temp. -78°C , zubożono przez dodanie roztworu 6,4ml AcOH w 10ml Et₂O i wylano do rozdzielacza, zawierającego 255ml eteru dietylowego i 30ml wody. Warstwę organiczną przemyto porcjami po 20ml odpowiednio: nasyconego roztworu węgla sodu i solanki. Natomiast warstwy wodne połączono i ekstrahowano 3×85ml Et₂O. Połączone frakcje organiczne suszono nad bezwodnym MgSO₄ i oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 18°C . Otrzymano 3,35g surowego produktu, który dalej oczyszczano z zastosowaniem flash chromatografii na żelu krzemionkowym (230-400mesh). Jako eluent stosowano układ rozpuszczalników heksan : AcOEt (5 : 1). Uzyskano lotny produkt **14** (2,6g; 62%) w postaci żółtego oleju (diastereoselektywność 8 : 1) $[\alpha]_D^{20} -4,2$ (*c* 1,1; CHCl₃); $R_f = 0,51$ (układ B), $R_f = 0,27$ (układ D).

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 2,45 (*m*, 1H, CH-4); 2,63 (*m*, 1H, CH-4); 2,99 (*m*, 1H, CH-3); 3,69 (*s*, 3H, OCH₃); 3,81 (*s*, 3H, OCH₃); 4,31 (*d*, *J* = 3Hz, 1H, CH-2); 5,19-5,11 (*dd*, *J* = 17Hz i 10Hz, 2H, CH-6); 5,82 (*m*, 1H, CH-5);

¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 32,36; 48,38; 52,27; 52,99; 70,36; 118,30; 134,91; 172,78; 174,21.

4.3.3. (2*R*,3*S*)-2-Acetoksy-3-allilobursztynian dimetylu

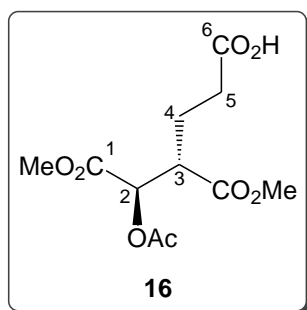


3-Allilojabłczan dimetylu (3,34g; 16,6mmoli), rozpuszczono w 20ml chlorku metylenu, dodano DMAP (202mg; 1,66mmoli), TEA (9,24ml; 66,2mmoli) i wkroplono świeżo destylowany Ac₂O (6,25ml; 66,2mmoli). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 12h w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę zakwaszono do pH 2 1*N* HCl i ekstrahowano eterem dietylowym (3×100ml). Połączone fazy eterowe suszono nad bezwodnym MgSO₄, a rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyszczano przy użyciu flash chromatografii na żelu krzemionkowym (230-400mesh). Jako eluent stosowano układ rozpuszczalników heksan : AcOEt (20 : 3). Uzyskano produkt **15** (2,1g; 52%) o R_f = 0,53 (układ D); R_f = 0,51 (układ G) .

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 2,13 (*s*, 3H, COCH₃); 2,34-2,23 (*m*, 1H, CH-4); 2,62-2,48 (*m*, 1H, CH-4); 3,11 (*dt*, *J* = 4,8Hz i 7,3Hz, 1H, CH-3); 3,69 (*s*, 3H, OCH₃); 3,75 (*s*, 3H, OCH₃); 5,05-5,02 (*m*, 1H, CH-6); 5,12-5,11 (*m*, 1H, CH-6); 5,25 (*d*, *J* = 4,8 Hz, 1H, CH-2); 5,83-5,64 (*m*, 1H, CH-5);

¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 21,50; 32,34; 47,03; 52,32; 53,73; 72,45; 119,23; 135,27; 170,06; 171,11; 172,24.

4.3.4. (2*R*,3*S*)-2-Acetoksy-3-metoksykarbonylowodoroadypinian 1-metylu

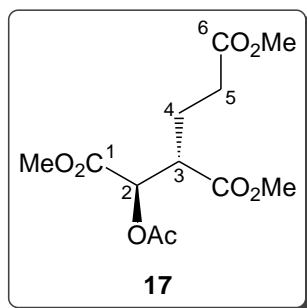


Do schłodzonego (0°C) roztworu (2*R*,3*S*)-2-acetoksy-3-allilojabłczanu dimetylu (2,1g; 8,6mmoli) w 11ml CH₂Cl₂ dodano strzykawką 94% BH₃•SMe₂ (0,86ml; 8,6mmoli). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez 2h. Następnie do reakcji wkroplono PDC (24,65g; 64,2mmoli) w 54 ml bezwodnego DMF i mieszano w temperaturze pokojowej przez 48h. Mieszaninę reakcyjną wylano do kolby, zawierającej 520ml wody i mieszano przez 16h, a następnie ekstrahowano eterem dietylowym (3×450ml). Ponadto frakcję wodną ekstrahowano octanem etylu (2×300ml). Warstwy organiczne połączone i suszono nad bezwodnym MgSO₄. Odsączono środek suszący i oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 1,5g surowego produktu, który oczyszczano przy zastosowaniu

flash chromatografii na żelu krzemionkowym (230-400mesh). Eluentem był układ rozpuszczalników: heksan : AcOEt (20 : 3; 20 : 5; a dalej MeOH). Uzyskano 1,5g 2-acetoksyhomoizocytrynianu trimetylu (**16**); $R_f = 0,13$ (układ G).

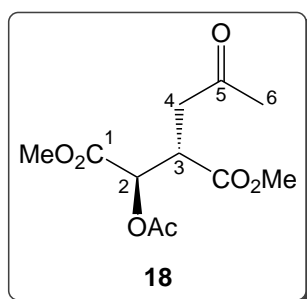
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 1,90 (*m*, 1H, **CH-4**); 2,11 (*m*, 1H, **CH-4**); 2,16 (*s*, 3H, **CH₃**); 2,46 (*m*, 1H, **CH-5**); 2,53 (*m*, 1H, **CH-5**); 3,14 (*m*, 1H, **CH-3**); 3,74 (*s*, 3H, **OCH₃**); 3,78 (*s*, 3H, **OCH₃**); 5,33 (*d*, $J = 4,9\text{Hz}$, 1H, **CH-2**).

Produkty uboczne:



(*2R,3S*)-2-Acetoksy-3-metoksykarbonyloadypinianu dimetylu (**17**) 82mg; $R_f = 0,33$ (układ G):

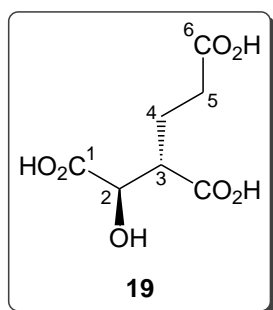
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 2,07 (*s*, 3H, **CH₃**); 1,90 (*m*, 1H, **CH-4**); 2,11 (*m*, 1H, **CH-4**); 2,41 (*m*, 1H, **CH-4**); 2,48 (*m*, 1H, **CH-4**); 3,62 (*m*, 1H, **CH-3**); 3,70 (*s*, 3H, **OCH₃**); 3,74 (*s*, 3H, **OCH₃**); 3,79 (*s*, 3H, **OCH₃**); 5,32 (*d*, $J = 4,9\text{Hz}$, 1H, **CH-2**).



(*2R,3S*)-2-Acetoksy-3-metoksykarbonylo--5-oksoheksanianu metylu (**18**) 105mg; $R_f = 0,27$ (układ G):

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 2,17 (*s*, 3H, **CH₃**); 2,24 (*s*, 3H, **CH₃**); 2,59 (*m*, 1H, **CH-4**); 3,05 (*m*, 1H, **CH-4**); 3,70 (*m*, 1H, **CH-3**); 3,74 (*s*, 3H, **OCH₃**); 3,79 (*s*, 3H, **OCH₃**); 5,39 (*d*, $J = 3,9\text{Hz}$, 1H, **CH-2**).

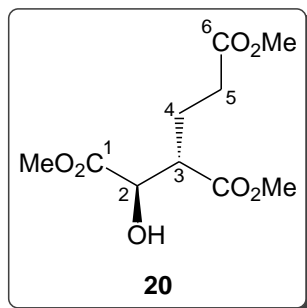
4.3.5. Kwas (*2R,3S*)-homoizocytrynowy



Do kolbki kulistej, zawierającej ester **16** (1,5g; 5,43mmoli) i ochłodzonej na łaźni lodowej, dodawano powoli 2,4% KOH. Po dodaniu wodorotlenku mieszaninę reakcyjną pozostawiono przez 1h w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym. Po tym czasie dodano 28,2g złoża jonowymiennego typu DOWEX 50W×2 – 100/200 i mieszano przez 1h. Następnie mieszaninę reakcyjną odsączono od jonitu pod zmniejszonym ciśnieniem, a przesącz odparowano do sucha na wyparce obrotowej. Otrzymano 630mg kwasu *D*-homoizocytrynowego w postaci ciemnożółtego oleju. Czysty kwas homoizocytrynowy (**19**) uzyskano po powtórnej reakcji estryfikacji, hydrolizie zasadowej i uwolnieniu na jonicie; bezbarwny, gęsty olej o $[\alpha]_D -11$ (*c*1,5; aceton) [lit.⁶⁹ $[\alpha]_D -10$ (*c*2; aceton)].

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 1,91 (*m*, 1H, **CH-4**); 2,03 (*m*, 1H, **CH-4**); 2,16 (*s*, 3H, **CH₃**); 2,40 (*m*, 1H, **CH-5**); 2,45 (*m*, 1H, **CH-5**); 2,90 (*m*, 1H, **CH-3**); 4,30 (*d*, $J = 4,9\text{Hz}$, 1H, **CH-2**).

4.3.6. (2*R*,3*S*)-Homoizocytrynian trimetylu



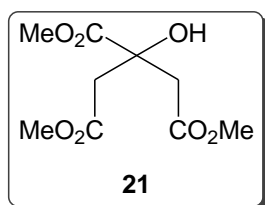
Kwas *D*-homoizocytrynowy (183,3mg; 0,9mmoli) zadano roztworem diazometanu w eterze dietylowym i pozostawiono w temperaturze pokojowej, w atmosferze gazu obojętnego (argon) przez 16h. Po tym czasie oddestylowano nieprzereagowany diazometan i rozpuszczalnik, pozostałość ‘przezoniono’ dwukrotnie eterem dietylowym. Uzyskano 260mg surowego produktu, który oczyszczano przy zastosowaniu chromatografii na żelu krzemionkowym (70-230mesh). Eluentem był układ rozpuszczalników heksan : AcOEt (2 : 1). Otrzymano produktu **20** (207mg; 94%), w postaci bezbarwnego oleju $[\alpha]_D -14,5$ (*c* 2; CHCl_3); $R_f = 0,40$ (układ B).

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 2,04 (*m*, 1H, **CH-4**); 2,21 (*m*, 1H, **CH-4**); 2,48 (*m*, 2H, 2×**CH-5**); 3,03 (*m*, 1H, **CH-3**); 3,71 (*s*, 3H, **OCH₃**); 3,72 (*s*, 3H, **OCH₃**); 3,83 (*s*, 3H, **OCH₃**); 4,33 (*d*, $J = 3,4\text{Hz}$, 1H, **CH-2**);

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 23,59; 31,80; 47,77; 51,98; 52,34; 53,09; 71,34; 172,66; 173,52; 173,84.

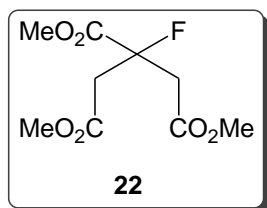
4.4. Synteza 2-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylanu trimetylu

4.4.1. Cytrynian trimetylu



Do ochłodzonego roztworu kwasu cytrynowego (**1**) (21g, 0,1mola) w 200ml bezwodnego metanolu, wkroplono SOCl_2 (26,3ml; 0,36mola) i ogrzewano przez 72h pod chłodnicą zwrotną z rurką odprowadzającą wydzielające się gazy: HCl i SO_2 . Po tym czasie z mieszaniny reakcyjnej usunięto rozpuszczalnik. Otrzymany surowy produkt krystalizowano z gorącej H_2O . Uzyskano cytrynian trimetylu (**21**) w postaci białych kryształów (20,4g; 87%) o t_f 78-79°C [lit.¹¹⁶ t_f 78-79°C].

4.4.2. 2-Fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylan trimetylu



W kolbie gruszkowej (25ml), w atmosferze gazu obojętnego (argon) przygotowano oziębiony do temperatury $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ roztwór DAST (181 μl ; 1,38mmoli) w 3,5ml bezwodnego chlorku metylenu. Następnie do tak przygotowanej mieszaniny, wkropiono ochłodzony roztwór cytrynianu trimetylu (**21**) (202mg; 0,86mmola) rozpuszczonego w 2,5ml chlorku metylenu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 1h, a następnie w temperaturze pokojowej przez 2h. Przebieg reakcji śledzono chromatograficznie w układzie E (dla produktu $R_f = 0,46$). Następnie - do mieszaniny reakcyjnej dodano 15ml chloroformu i przemywano kolejno: 5% roztworem NaHCO_3 , wodą i solanką. Uzyskano 173mg surowego produktu, który był mieszaniną 3-fluorodeokscytrynianu i *trans*-akonitynianu trimetylu. Mieszaninę wstępnie rozdzielono przy zastosowaniu techniki SPE (*solid phase extraction*), czyli ekstrakcji do fazy stałej, w układzie faz normalnych. Elucję prowadzono gradientowo w układach (500 μl) - heksan : CHCl_3 (9 : 1; 8 : 2; 7 : 3), otrzymując *trans*-akonitynian trimetylu (59mg; 27%), $R_f = 0,60$ (układ D) oraz w układach (500 μl) heksan : CHCl_3 (6,5 : 3,5; 6 : 4), uzyskując 3-fluorodeokscytrynian trimetylu 114mg, $R_f = 0,47$ (układ D).

Tak otrzymany 2-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylan trimetylu oczyszczano następnie z zastosowaniem preparatywnego HPLC. Rozdział był wykonywany w układzie faz odwróconych.

Parametry	Wartość/rodzaj		
Przedkolumna	Eclipse XDB-C18 4-Pack Analytical Guard Column 4,6 \times 12.5mm 5-Micron		
Kolumna chromatograficzna preparatywna	ZORBAX 80 SB-C8 2-Pack Preparative Guard Column 9,4 \times 15mm 7-Micron		
Przygotowanie próbki	45mg próbki rozpuszczono w 1,5ml metanolu		
Objętość dozowanej próbki [μl]	50		
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej [ml/min]	1		
Program elucji	Gradientowy		
Skład fazy ruchomej	czas (min)	H_2O (%)	metanol (%)
	0	80	20

	12	60	40
	18	50	50
	25	50	50
	35	80	20
	50	80	20
Temperatura [°C]	25		
Długość fali [nm]	210,16		
Referencja	włączona		

Tabela 7. Warunki pracy preparatywnego chromatografu cieczowego HPLC z detektorem DAD.

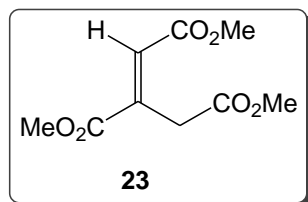
Uzyskano produkt **22** (92mg; 45%):

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 3,07 (AB, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,12 (AB, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,73 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,89 (s, 3H, CO_2CH_3);

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 41,08 ($^2J_{\text{FC}} = 24,4\text{Hz}$); 52,24; 53,14; 91,66 ($^1J_{\text{FC}} = 195,3\text{Hz}$); 168,35 ($^3J_{\text{FC}} = 3,8\text{Hz}$); 169,85 ($^2J_{\text{FC}} = 24,4\text{Hz}$).

^{19}F NMR (CDCl_3) δ [ppm]: -160,8 (m)

trans-akonitynian trimetylu (**23**):



^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 3,71 (s, 3H, OCH_3); 3,78 (s, 3H, OCH_3); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 3,98 (s, 2H, CH_2); 6,97 (s, 1H, $=\text{CH}$);

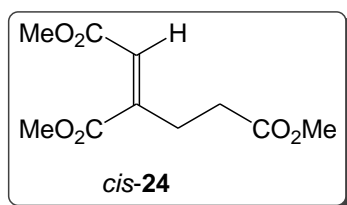
^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 32,98; 52,07; 52,16; 52,90; 129,09; 140,05; 165,81; 166,46; 170,33.

4.5. Synteza homoakonitynianu trimetylu

4.5.1. Homoakonitynian trimetylu

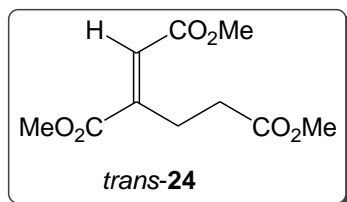
Do ochłodzonego roztworu laktonu kwasu homocytrynowego (**11**) (1,24g; 6,6mmoli) w 40 ml benzenu, wkroplono SOCl_2 (0,96ml; 13,2mmoli) i ogrzewano przez 48h. Po tym czasie z mieszaniny reakcyjnej usunięto rozpuszczalnik. Uzyskano chlorek **30** (1,21g; 82%) o konsystencji ciemnobrązowego oleju. Do dichlorku laktonu kwasu homocytrynowego (1,21g; 5,4mmoli) wkroplono bezwodny brom (0,3ml; 5,4mmoli) i ogrzewano ok. 1h w temperaturze ok. 140°C . Następnie wkroplono dodatkową $\frac{1}{4}$ wyjściowej ilości bromu i kontynuowano ogrzewanie przez noc. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono, dodano 50ml bezwodnego metanolu i ogrzewano pod chłodnicą

zwrotną przez 3-4h. Z mieszaniny poreakcyjnej oddestylowano rozpuszczalnik, a pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i przemywano kolejno: 2% roztworem Na₂SO₃, wodą, 3% roztworem Na₂CO₃ i wodą. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO₄ i usunięto rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 527mg surowego produktu, który rozdzielono przy użyciu chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (70–230mesh). Otrzymano 354mg *cis*-homoakonitynianu trimetylu o R_f = 0,47 (układ F) oraz 33mg *trans*-homoakonitynianu trimetylu o R_f = 0,53 (układ F).



¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 2,55 (*t*, 2H, CH₂); 2,69 (*t*, 2H, CH₂); 3,69 (*s*, 3H, OCH₃); 3,73 (*s*, 3H, OCH₃); 3,83 (*s*, 3H, OCH₃); 5,90 (*s*, 1H, =CH-);

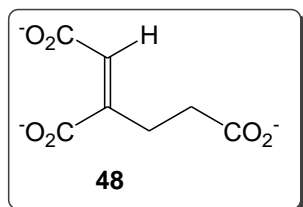
¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 29,16; 31,49; 51,86; 51,91; 52,44; 120,86; 147,67; 165,21; 168,51; 172,08.



¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 2,54 (*t*, 2H, CH₂); 3,09 (*t*, 2H, CH₂); 3,67 (*s*, 3H, OCH₃); 3,78 (*s*, 3H, OCH₃); 3,82 (*s*, 3H, OCH₃); 6,82 (*s*, 1H, =CH-);

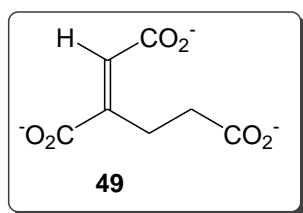
¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 23,58; 33,28; 51,92; 52,14; 52,91; 127,94; 146,12; 166,01; 167,10; 173,08.

4.5.2. *cis*-Homoakonitynian trisodowy



Do *cis*-homoakonitynianu trimetylu (*cis*-24) (26,2mg; 0,12mmoli), rozpuszczonego w 0,34ml metanolu, dodano 0,34ml 1M NaOH. Całość mieszano w temperaturze pokojowej, aż do całkowitego przereagowania substancji, a przebieg hydrolizy obserwowano chromatograficznie. Po 24h reakcję zakończono, oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a powstały osad ‘przeгонiono’ kilkakrotnie bezwodnym metanolem, a dalej bezwodnym eterem dietylowym. Otrzymano *cis*-homoakonitynian trisodowy (18,9mg; 62%) w postaci pomarańczowego bezpostaciowego proszku.

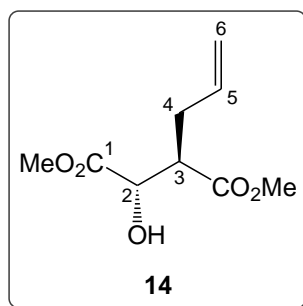
4.5.3. *trans*-Homoakonitynian tripotasowy



trans-Homoakonitynian trimetylu (*trans*-**24**) (28mg; 0,12mmoli), rozpuszczono w 20ml bezwodnego eteru dietylowego. Do tak przygotowanego roztworu dodano trimetylosilanolan potasu (51mg; 0,4mmoli) i mieszano przez dobę w temperaturze pokojowej. Następnie z mieszaniny reakcyjnej usunięto rozpuszczalnik. Pozostałość zawieszono w 25ml bezwodnego eteru dietylowego, odsączono, przemyto 10ml bezwodnego eteru dietylowego i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano produkt **49** (32mg; 89%) w postaci brązowego bezpostaciowego proszku.

4.6. Synteza (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-metoksykarbonylowodoroadypinianu 1-metylu

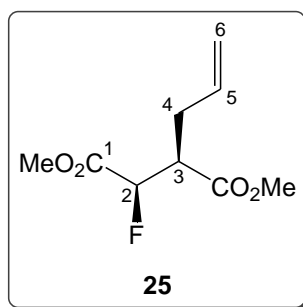
4.6.1. (2*S*,3*R*)-3-Allilo-2-hydroksybursztynian dimetylu



(2*S*,3*R*)-3-Allilo-2-hydroksybursztynian dimetylu otrzymano analogicznie do jego izomeru *D* (rozdział 4.3.2), wychodząc z kwasu *L*-jabłkowego, z wydajnością 58% w postaci żółtego oleju (diastereoselektywność 8 : 1) [α]_D²⁰ +16,1 (*c*1,24; CHCl₃); R_f = 0,51 (układ B), R_f = 0,27 (układ D).

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 2,45 (*m*, 1H, CH-4); 2,63 (*m*, 1H, CH-4); 2,99 (*m*, 1H, CH-3); 3,69 (*s*, 3H, OCH₃); 3,81 (*s*, 3H, OCH₃); 4,31 (*d*, *J* = 3Hz, 1H, CH-2); 5,19-5,11 (*dd*, *J* = 17Hz i 10Hz, 2H, CH-6); 5,82 (*m*, 1H, CH-5);
¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 32,36; 48,38; 52,27; 52,99; 70,36; 118,30; 134,91; 172,78; 174,21.

4.6.2. (2*R*,3*R*)-2-Fluoro-3-allilobursztynian dimetylu



W kolbie gruszkowej (50ml), w atmosferze gazu obojętnego (argon) przygotowano oziębiony do temperatury -78°C roztwór DAST (760μl; 5,9mmoli) w 30ml bezwodnego chlorku metylenu. Następnie do tak przygotowanej mieszaniny, wkroplono ochłodzony roztwór (2*S*,3*R*)-3-allilo-2-hydroksybursztynian dimetylu (894mg; 4,4mmoli) w 10ml

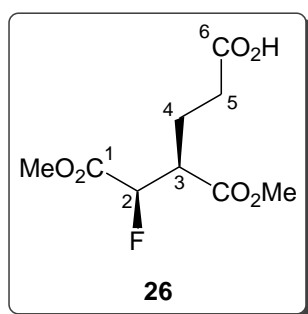
chlorku metylenu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze -70°C przez 1h, a następnie w temperaturze pokojowej przez 2h. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 40ml chloroformu i przemyto ją kolejno: 5% roztworem NaHCO_3 , wodą i solanką. Uzyskano 1,2g surowego produktu, który oczyszczano z zastosowaniem chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230-400mesh). Jako eluent stosowano układ rozpuszczalników heksan : AcOEt (9 : 1). Otrzymano produkt **25** (805mg; 89%) w postaci jasnożółtego oleju (diastereoselektywność 5 : 1) o $[\alpha]_D^{20} +2,5$ (c1,7; CHCl_3); $R_f = 0,37$ (układ D).

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 2,46 (*m*, 1H, **CH**-4), 2,60 (*m*, 1H, **CH**-4), 3,10 (*m*, 1H, **CH**-3), 3,73 (*s*, 3H, **OCH**₃); 3,83 (*s*, 3H, **OCH**₃); 5,11 (*m*, 1H, **FCH**-2); 5,18 (*m*, 1H, **CH**-6); 5,24 (*m*, 1H, **CH**-6); 5,76 (*m*, 1H, **CH**-5);

^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 38,21; 47,74 ($^2J_{\text{FC}} = 21,5$ Hz); 52,13; 52,62; 88,20 ($J_{\text{FC}} = 190,2$ Hz); 119,57; 133,08; 165,68; 169,06.

^{19}F NMR (CDCl_3) δ [ppm]: -198,16 (*dd*, $^3J_{\text{HF}} = 21\text{Hz}$; $^2J_{\text{HF}} = 47\text{Hz}$).

4.6.3. (2*R*,3*R*)-2-Fluoro-3-metoksykarbonylowodoroadypinian 1-metylu

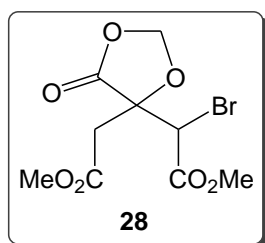


Do ochłodzonego w łaźni lodowej, roztworu (2*R*,3*R*)-3-allilo-2-fluorobursztynianu dimetylu (1,03g; 5,05mmoli) w 8ml chlorku metylenu, wkroplono 94% $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$ (0,51ml; 5,05mmoli). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez 2h. Następnie do reakcji dodano powoli PDC (14,54g; 37,9mmoli) w 30ml bezwodnego DMF i mieszano w temperaturze pokojowej przez 48h. Po tym czasie, mieszaninę reakcyjną wylano do kolby, zawierającej 290ml wody i mieszano przez 16h, a następnie ekstrahowano eterem dietylowym (3×250ml). Frakcję wodną dodatkowo ekstrahowano octanem etylu (2×170ml). Warstwy organiczne połączono i suszono nad bezwodnym MgSO_4 . Odsączono środek suszący i oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 1,89g surowego produktu, który oczyszczano przy zastosowaniu flash chromatografii na żelu krzemionkowym (230-400mesh). Prowadzono elucję gradientową z zastosowaniem układu rozpuszczalników: heksan : AcOEt (20 : 3, 20 : 4; a dalej AcOEt i MeOH). Uzyskano 584mg mieszaniny, zawierającej związku: **26** : *cis*-**27** : *trans*-**27** (7 : 3 : 1), a po próbie oczyszczania za pomocą techniki SPE uzyskano mieszaninę tych związków w stosunku ilościowym 1 : 1 : 1.

Dla **26**: ^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 2,05-1,93 (*m*, 1H, **CH**-4); 2,19-2,07 (*m*, 1H, **CH**-4); 2,62-2,38 (*m*, 2H, **CH**-5); 3,18-3,03 (*m*, 1H, **CH**-3); 5,32-5,22 (*dd*, $^3J_{\text{HH}} = 4,4\text{Hz}$, $^2J_{\text{HF}} = 47,4\text{Hz}$, 1H, **FCH**-2).

4.7. Synteza bromopochodnych metylenocytrynianu dimetylu

4.7.1. 2-Bromometylenocytrynian dimetylu



Do chlorku kwasowego monoestru metylowego kwasu metylenocytrynowego (*rac*-**5**) (2,01g; 8,5mmola) wkropiono bezwodny brom (0,44ml; 8,5mmola): pierwszą połowę porcji przez ok. 10 minut, a następnie drugą połowę w jednej porcji i ogrzewano w temperaturze ok. 80°C przez 1h. Po upływie tego czasu wkropiono dodatkowo $\frac{1}{4}$ wyjściowej ilości suchego bromu (0,11ml) i ogrzewano przez noc w temperaturze ok. 130°C aż do momentu całkowitego przereagowania substratów. Aparaturę zabezpieczono systemem odprowadzającym wydzielający się podczas reakcji bromowodór. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temp. -20°C i wkraplano 160ml bezwodnego metanolu. Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 24h. Po tym czasie, z mieszaniny reakcyjnej oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem rozpuszczalnik. Pozostałość rozpuszczono w 120ml AcOEt i przemywano kolejno porcjami po 40ml: 2% roztworem Na_2SO_3 , H_2O , 2 razy 3% roztworem Na_2CO_3 i H_2O . Warstwę octanową suszono nad bezwodnym MgSO_4 , przesączono i usunięto rozpuszczalnik. Otrzymano 1,76g surowego produktu, który oczyszczano przy użyciu chromatografii na żelu krzemionkowym (< 200mesh). Jako eluent stosowano heksan modyfikowany octanem etylu. Uzyskano 2-bromometylenocytrynian dimetylu w postaci dwóch czystych diastereoizomerów:

28a (363mg; 14%), $R_f = 0,53$ (układ F):

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 3,20 (*AB*, $J = 17\text{Hz}$, 2H, **CH**₂CO); 3,74 (*s*, 3H, **OCH**₃); 3,83 (*s*, 3H, **OCH**₃); 4,57 (*s*, 1H, **CHBrCO**₂CH₃); 5,66 (*AB*, 2H, **OCH**₂O);

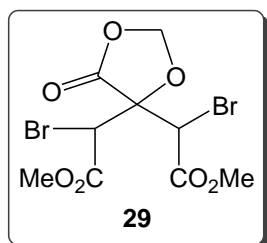
^{13}C NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 40,90; 48,08; 52,82; 54,11; 95,88; 96,15; 167,17; 169,39; 170,35.

28b (468mg; 18%), $R_f = 0,46$ (układ F):

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 3,14 (AB, $J = 17\text{Hz}$, 2H, CH_2CO); 3,72 (*s*, 3H, OCH_3); 3,84 (*s*, 3H, OCH_3); 4,54 (*s*, 1H, $\text{CHBrCO}_2\text{CH}_3$); 5,61 (AB, 2H, OCH_2O);

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 39,28; 46,75; 52,91; 54,11; 96,08; 96,11; 167,10; 169,32; 170,45.

4.7.2. 2,2'-Dibromometylenocytrynian dimetylu

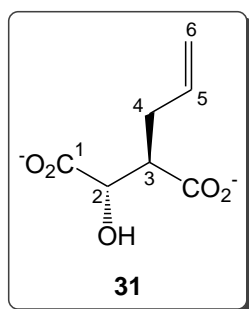


Do roztworu wodorometylenocytrynianu monometylu (**5**) (2g; 9,2mmola) w 10ml tetrachlorku węgla, z dodatkiem benzenu (2ml), wkroplono powoli PBr_3 (0,86ml, 9,2mmola) i ogrzewano do wrzenia przez 24h. Następnie wkroplono bezwodny brom (0,94ml; 18,4mmoli): pierwszą połowę porcji przez ok. 10 minut, a następnie drugą połowę w jednej porcji i kontynuowano ogrzewanie w temperaturze ok. 80°C przez 1h. Po upływie tego czasu wkroplono dodatkowo $\frac{1}{4}$ wyjściowej ilości bromu (0,24ml) i ogrzewano do wrzenia przez noc, aż do momentu całkowitego przereagowania substratów. Aparaturę zabezpieczono systemem odprowadzającym wydzielający się podczas reakcji bromowodór. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temp. -20°C i wkroplono 160ml bezwodnego metanolu. Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 2-3h. Po tym czasie, z mieszaniny reakcyjnej oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem rozpuszczalnik. Pozostałość rozpuszczono w 120ml H_2O i ekstrahowano porcjami $3 \times 40\text{ml}$ porcjami eteru dietylowego. Frakcje eterowe połączono i przemywano kolejno porcjami po 40ml: 5% roztworem KHSO_4 , H_2O , 5% roztworem NaHCO_3 i H_2O . Warstwę eterową suszono nad bezwodnym MgSO_4 , przesączono i usunięto rozpuszczalnik. Po krystalizacji z octanu etylu otrzymano produkt **29** (720mg; 20%) w postaci białych kryształów o t_f $139\text{-}141^\circ\text{C}$, $R_f = 0,62$ (układ F).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 3,82 (*s*, 3H, OCH_3); 3,85 (*s*, 3H, OCH_3); 4,88 (*s*, 1H, CHBr); 5,21 (*s*, 1H, CHBr); 5,61 (AB, 2H, OCH_2O).

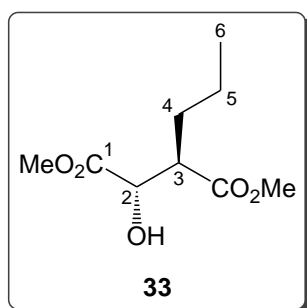
4.8. Kwasy alkilodikarboksylowe

4.8.1. (2*S*,3*R*)-3-Allilojabłczan dipotasowy



(2*S*,3*R*)-3-Allilojabłczan dimetylu (**14**) [α]_D +16,1 (*c*1,24; CHCl₃) (40,4mg; 0,2mmola) rozpuszczono w 20ml bezwodnego eteru dietylowego. Do tak przygotowanego roztworu dodano trimetylosilanolan potasu (56mg; 0,44mmoli) i mieszano przez dobę w temperaturze pokojowej. Następnie z mieszaniny reakcyjnej usunięto rozpuszczalnik. Pozostałość zawieszono w 25ml bezwodnego eteru dietylowego, odsączono, przemyto 10ml bezwodnego eteru dietylowego i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano produkt **31** (35mg; 70%) w postaci żółtego bezpostaciowego proszku.

4.8.2. (2*S*,3*R*)-3-Propylojabłczan dimetylu

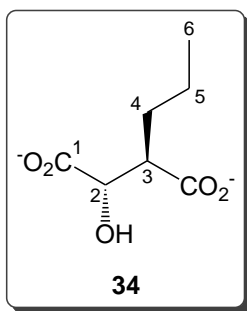


(2*S*,3*R*)-3-Allilojabłczan dimetylu (**27**) (71,9g; 0,35mmola) rozpuszczono w 3ml bezwodnego metanolu, dodano 8mg 10% Pd/C i prowadzono wodorolizę przez kilka godzin, której przebieg śledzono chromatograficznie. Po zakończeniu wodorolizy odsączono katalizator, który przemyto kilkakrotnie bezwodnym metanolem. Oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość 'przezoniono' bezwodnym metanolem i kilkakrotnie bezwodnym eterem dietylowym. Otrzymano (2*S*,3*R*)-3-propylojabłczanu dimetylu (**33**) (67mg; 94%) w postaci bezbarwnego oleju o [α]_D +7,6 (*c*1,3; CHCl₃) o R_f = 0,34 (układ D).

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 0,95 (*t*, 3H, CH₃), 1,41 (*m*, 2H, CH-5), 1,66 (*m*, 1H, CH-4), 1,83 (*m*, 1H, CH-4), 3,69 (*s*, 3H, OCH₃); 3,80 (*s*, 3H, OCH₃); 4,29 (*d*, *J* = 3,9Hz, 1H, CHOH);

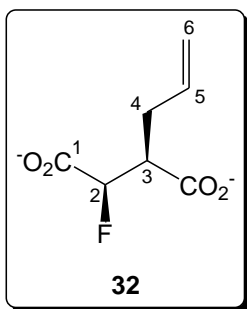
¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 14,08; 20,79; 30,36; 48,54; 52,18; 52,93; 71,22; 173,74; 174,18.

4.8.3. (2*S*,3*R*)-3-Propylojabłczan dipotasowy



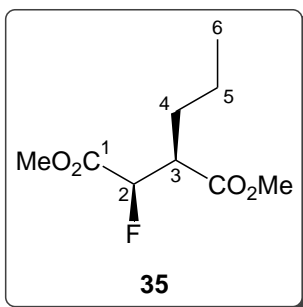
Hydrolizę estrów metylowych (2*S*,3*R*)-3-propylojabłczanu dimetylu (**33**) (32,8mg; 0,16mmoli) przeprowadzono analogicznie do procedury otrzymywania (2*S*,3*R*)-3-allilobjabłczanu dipotasowego (podrozdział 4.8.1). Używając trimetylosilanolan potasu (45,4mg; 0,35mmoli), uzyskano produkt **34** (35,7mg; 88,5%) w postaci jasnożółtego bezpostaciowego proszku.

4.8.4. (2*R*,3*R*)-2-Fluoro-3-allilobursztynian dipotasowy



Hydrolizę estrów metylowych (2*S*,3*R*)-2-fluoro-3-allilobursztynianu dimetylu (**25**) (33,2mg; 0,16mmoli) przeprowadzono analogicznie do procedury otrzymywania (2*S*,3*R*)-3-allilobjabłczanu dipotasowego (podrozdział 4.8.1). Używając trimetylosilanolan potasu (48mg; 0,36mmoli), uzyskano produkt **32** (32mg; 79%) w postaci brązowego bezpostaciowego proszku.

4.8.5. (2*R*,3*R*)-2-Fluoro-3-propylobursztynian dimetylu



Metoda 1:

(2*R*,3*R*)-2-Fluoro-3-allilobursztynian dimetylu (**25**) (67g; 0,33mmola) rozpuszczono w 3ml bezwodnego metanolu, dodano 16mg 10% Pd/C i prowadzono wodorolizę przez kilka godzin, której przebieg śledzono chromatograficznie. Po zakończeniu wodorolizy odsączono katalizator, który przemyto kilkakrotnie bezwodnym metanolem. Oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość 'przeгонiono' bezwodnym metanolem i kilkakrotnie bezwodnym eterem dietylowym. Otrzymano związek **35** (61,4mg; 90%) w postaci bezbarwnego oleju o $[\alpha]_D +5,0$ (c 0,8; CHCl₃); R_f = 0,65 (układ D).

Metoda 2:

W kolbie gruszkowej (50ml), w atmosferze gazu obojętnego (argon) przygotowano oziębiony do temperatury -78°C roztwór DAST (185μl; 1,3mmoli) w 20ml bezwodnego chlorku metylenu. Następnie do tak przygotowanej mieszaniny, wkroplono ochłodzony roztwór (2*S*,3*R*)-3-propylojabłczan dimetylu (**33**) (203mg; 1mmol) w 10ml chlorku metylenu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze -70°C przez 1h, a następnie

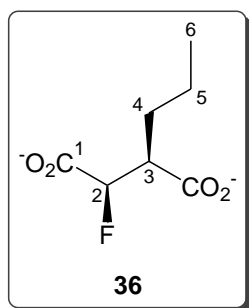
w temperaturze pokojowej przez 2h. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 15ml chloroformu i przemyto ją kolejno: 5% roztworem NaHCO₃, wodą i solanką. Uzyskano 268mg surowego produktu, który oczyszczano z zastosowaniem chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230-400mesh). Jako eluent stosowano układ rozpuszczalników heksan : AcOEt (9 : 1, 9 : 2, itp.). Otrzymano produkt **35** (44,7mg; 22%) w postaci bezbarwnego oleju.

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 0,93 (*t*, 3H, CH₃), 1,32 (*m*, 1H, CH-5), 1,43 (*m*, 1H, CH-5), 1,62 (*m*, 1H, CH-4), 1,82 (*m*, 1H, CH-4), 2,98 (*m*, 1H, CH-3), 3,74 (*s*, 3H, OCH₃); 3,82 (*s*, 3H, OCH₃); 5,16 (*dd*, ²J_{HF} = 47,4Hz, ³J_{HH} = 5,9Hz, 1H, FCH-2);

¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 14,07; 20,67; 29,30; 47,91 (²J_{FC} = 23,8Hz); 52,43; 52,85; 88,92 (J_{FC} = 197,3Hz); 169,04; 172,21.

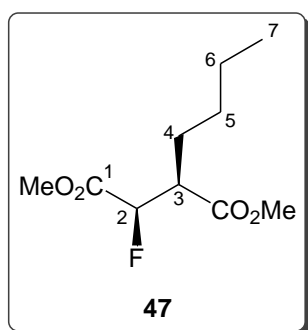
¹⁹F NMR (CDCl₃) δ[ppm]: -197,51 (*dd*, ³J_{HF} = 23Hz oraz ²J_{HF} = 47Hz).

4.8.6. (2*R*,3*R*)-2-Fluoro-3-propylobursztynian dipotasowy



Hydrolizę estrów metylowych (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-propylobursztynianu dimetylu (**35**) (29,4mg; 0,14mmoli) przeprowadzono analogicznie do procedury otrzymywania (2*S*,3*R*)-3-allilobjabczanu dipotasowego (podrozdział 4.8.1). Używając trimetylosilanolan potasu (46mg; 0,36mmoli), uzyskano produkt **36** (32,4mg; 91%) w postaci jasnożółtego bezpostaciowego proszku.

4.8.7. (2*R*,3*R*)-2-Fluoro-3-butylobursztynian dimetylu



(2*R*,3*R*)-2-Fluoro-3-butylobursztynian dimetylu (**47**) 12mg otrzymano jako produkt uboczny syntezy związku **26** (podrozdział 4.6.) o R_f = 0,66 (układ G).

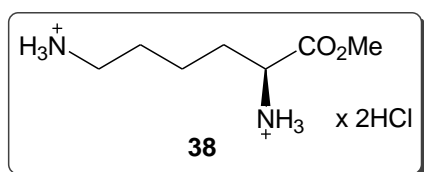
¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 0,93 (*t*, 3H, CH₃), 1,24 (*m*, 1H, CH-5), 1,32 (*m*, 1H, CH-6), 1,41 (*m*, 1H, CH-5), 1,53 (*m*, 1H, CH-6), 1,62 (*m*, 1H, CH-4); 1,82 (*m*, 1H, CH-4); 2,99 (*m*, 1H, CH-3), 3,74 (*s*, 3H, OCH₃); 3,82 (*s*, 3H, OCH₃); 5,17 (*dd*, 1H,

²J_{HF} = 42,0, Hz, ³J_{HH} = 5,9 Hz, FCH-2);

¹⁹F NMR (CDCl₃) δ[ppm]: -197,46 (*dd*, ³J_{HF} = 19,2Hz oraz ²J_{HF} = 46,8Hz).

4.9. Synteza α -difluorometylo-*L*-lizyny

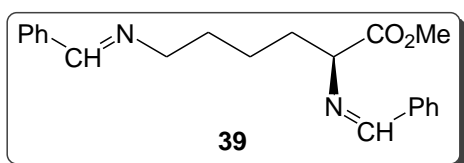
4.9.1. Dichlorowodorek estru metylowego *L*-lizyny



Dichlorowodorek estru metylowego *L*-lizyny o *tt* 207°C otrzymano z *L*-lizyny (**37**), bezwodnego metanolu oraz SOCl₂ z wydajnością 79% (lit.¹⁰⁶ *tt* 210°C).

¹H NMR (D₂O) δ [ppm]: 1,49-1,33 (*m*, 2H, CH₂); 1,62 (*m*, 2H, CH₂); 1,98-1,82 (*m*, 2H, CH₂); 2,91 (*t*, 2H, CH₂NH₃⁺); 3,75 (*s*, 3H, OCH₃); 4,07 (*t*, 1H, CHNH₃⁺).

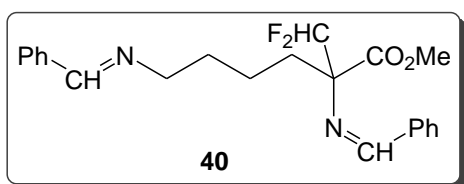
4.9.2. (*S*)-2,6-Dibenzylidenoaminoheksanian metylu



Do zawiesiny dichlorowodoru estru metylowego *L*-lizyny (**38**) (9,83g; 50mmoli) w 75ml chlorku metylenu dodano świeżo przedestylowany benzaldehyd (10,15ml; 0,1mola). Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do 0°C, mieszając, wkroplono powoli roztwór (13,9ml; 0,1mola) trietyloaminy w 20ml chlorku metylenu i pozostawiono w temperaturze pokojowej na noc. Usunięto rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w bezwodnym eterze dietylowym. nierozpuszczalny materiał odsączono, a przesącz przemyto kilkakrotnie wodą i solanką, suszono nad bezwodnym MgSO₄ i zateżono. Produkt **39** otrzymano z wydajnością 90% jako gęsty, żółty olej. Surowy produkt został użyty do dalszej syntezy.

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 1,48-1,36 (*m*, 2H, CH₂); 1,79-1,72 (*m*, 2H, CH₂); 2,06-1,98 (*m*, 2H, CH₂); 3,67-3,57 (*dd*, 2H, *J* = 6,8Hz; *J* = 12,8Hz CH₂N); 3,73 (*s*, 3H, OCH₃); 4,04-3,96 (*dd*, 1H, *J* = 6Hz; *J* = 7,7Hz; CHN); 7,44-7,29 (*m*, 6H, 2×Ph); 7,79-7,64 (*m*, 4H, 2×Ph); 8,28-8,25 (*AB*, 2H, 2×N=CH-Ph).

4.9.3. 2,6-Dibenzylidenoamino-2-difluorometyloheksanian metylu



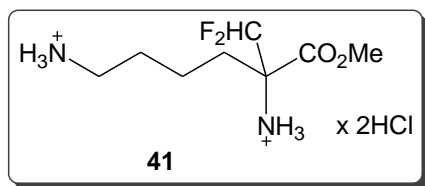
Do roztworu diizopropylaminy (0,7ml; 5mmoli) w 5ml bezwodnego THF, schłodzonego do temperatury -78°C wkroplono powoli *n*-BuLi (2ml roztworu 2,5*M* w heksanie) w atmosferze gazu obojętnego (azotu). Mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury -20°C i pozostawiono w niej przez 10 min, a następnie ponownie schłodzono do -78°C. Do tak

przygotowanego roztworu LDA dodawano związek **39** (1,5g; 4,5mmola) rozpuszczony w 9ml bezwodnego THF, utrzymując jednocześnie temperaturę w granicach $-75^{\circ}\text{C} \div -70^{\circ}\text{C}$. Po dodaniu reagentów, temperaturę reakcji podniesiono do $+40^{\circ}\text{C}$, wymieniając w aparaturze balon z azotem na pusty i zaczęto wprowadzać pod powierzchnię cieczy przez septum freon - chlorodifluorometan (proces nasycania freonem osiągnięto w momencie, gdy balon zwiększył swoją objętość dwukrotnie). Mieszaninę reakcyjną utrzymywano w temperaturze $40^{\circ}\text{C} \div 50^{\circ}\text{C}$ w atmosferze freonu przez co najmniej 5h, uzupełniając sukcesywnie ubytek freonu w aparaturze. Następnie mieszaninę reakcyjną wylano na lód ekstrahowano eterem dietylowym ($3 \times 30\text{ml}$). Połączone frakcje eterowe suszono nad bezwodnym MgSO_4 , następnie usunięto rozpuszczalnik, otrzymując 1,5g oleju będącego mieszaniną substratu i produktu, odpowiednio:

40 : **39** (2 : 1), co stwierdzono na podstawie widma ^1H NMR. Pochodna **40** jest niestabilna podczas chromatografii kolumnowej oraz destylacji.

^1H NMR (CDCl_3) δ [ppm]: 1,56-1,51 (*m*, 2H, CH_2); 1,81-1,75 (*m*, 2H, CH_2); 2,17-2,10 (*m*, 2H, CH_2); 3,65 (*t*, 2H, $=\text{NCH}_2$); 3,81 (*s*, 3H, OCH_3); 6,32-6,10 (*t*, 1H, CHF_2); 7,48-7,35 (*m*, 6H, $2 \times \text{Ph}$); 7,73-7,71 (*m*, 2H, Ph); 7,81-7,79 (*m*, 2H, Ph); 8,28 (*s*, 1H, $\text{N}=\text{CH}-\text{Ph}$); 8,42 (*s*, 1H, $\text{N}=\text{CH}-\text{Ph}$).

4.9.4. Dichlorowodorek estru metylowego 2-difluorometylolizyny



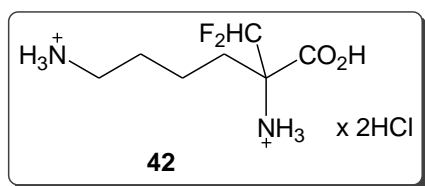
Mieszaninę związków **39** i **40** (1,25g) w 7ml eteru dietylowego i 10ml 2N HCl energicznie mieszano przez 3h w temperaturze pokojowej. Fazę wodną oddzielono, przemyto 10ml eteru dietylowego i zatężono pod próżnią. Pozostałość rozpuszczono w metanolu i zaszczepiono kryształkiem produktu. Wypadał produkt **41** (595mg) w postaci białych kryształów o t_t 193-194 $^{\circ}\text{C}$ (lit.¹⁰⁶ t_t 207 $^{\circ}\text{C}$).

^1H NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 1,42-1,35 (*m*, 1H, CH_2); 1,64-1,56 (*m*, 1H, CH_2); 1,76-1,70 (*m*, 2H, CH_2); 2,06-1,99 (*m*, 1H, CH_2); 2,22-2,16 (*m*, 1H, CH_2); 2,97 (*t*, 2H, CH_2NH_3^+); 3,96 (*s*, 3H, OCH_3); 6,54 (*t*, $J_{\text{HF}} = 53\text{Hz}$, 1H, CHF_2);

^{13}C NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 21,20; 28,32; 32,07; 40,26; 55,14; 66,09; 115,49 ($J_{\text{CF}} = 249,5\text{ Hz}$); 167,38;

^{19}F NMR (CD_3OD) δ [ppm]: -128,17 (*dd*, $J_{\text{HF}} = 53\text{Hz}$; $J_{\text{FF}} = 286\text{Hz}$) ; -133,77 (*dd*, $J_{\text{HF}} = 53\text{Hz}$; $J_{\text{FF}} = 286\text{Hz}$)

4.9.5. Dichlorowodorek α -difluorometylolizyny



Związek **41** (425mg; 1,5mmola) rozpuszczono w 1ml 3,6*N* HCl i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 4 dni. Po zateżeniu roztworu na wyparce próżniowej, pozostałość rozpuszczono w metanolu i sproszkowano. Po rekrystalizacji z mieszaniny metanolu/acetonu otrzymano biały, krystaliczny produkt **42** (270mg; 70%) o $tt > 240^{\circ}\text{C}$ (r) [lit.¹⁰⁶ $tt > 260^{\circ}\text{C}$ (r) (H₂O/EtOH)].

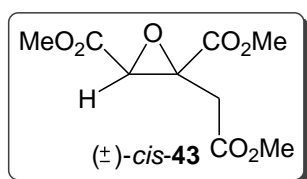
¹H NMR (D₂O) δ [ppm]: 1,24-1,20 (*m*, 1H, CH₂); 1,41-1,37 (*m*, 1H, CH₂); 1,61-1,55 (*m*, 2H, CH₂); 1,77-1,71 (*dt*, 1H, CH₂CO); 1,95-1,88 (*dt*, 1H, CH₂CO); 2,87 (*t*, $J = 7,5\text{Hz}$, 2H, CH₂NH₃⁺); 6,17 (*t*, $J_{\text{HF}} = 53,2\text{Hz}$, 1H, CHF₂);

¹³C NMR (D₂O) δ [ppm]: 19,87; 26,62; 30,40; 39,07; 65,83; 115,45 ($J_{\text{CF}} = 246,8\text{ Hz}$); 169,60;

¹⁹F NMR(D₂O) δ [ppm]: -127,12 (*dd*, $J_{\text{HF}} = 53\text{Hz}$ oraz $J_{\text{FF}} = 280,6\text{Hz}$) ; -132,84 (*dd*, $J_{\text{HF}} = 53\text{Hz}$ oraz $J_{\text{FF}} = 280,6\text{Hz}$)

4.10. Kwasy 1,2-epoksy-1,2,3-propanotrikarboksyłowe oraz 1,2-epoksy-1,2,4-butanotrikarboksyłowe

4.10.1. Epoksyd *cis*-akonitynianu trimetylu



Metoda z zastosowaniem H₂O₂ i kwasu wolframowego

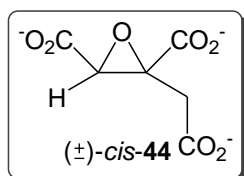
Bezwodnik kwasu *cis*-akonitynowego (**45**) (1,01g; 6,4mmoli) rozpuszczono w 11,5ml H₂O i dodano roztwór kwasu wolframowego (130mg; 0,52mmola) w 660 μ l 30% H₂O₂. Całość mieszano przez 90 minut w temperaturze 40°C. Następnie mieszaninę reakcyjną przelano do ekstraktora i prowadzono ekstrakcję ciągłą ciecz-ciecz eterem dietylowym przez noc. Z ekstraktu usunięto rozpuszczalnik, otrzymując 889mg bezbarwnego opalizującego oleju, będącego mieszaniną epoksydu kwasu *cis*-akonitynowego oraz kwasu *cis*- i *trans*-akonitynowego w stosunku objętościowym odpowiednio 2 : 1 : 1 (stwierdzono na podstawie widma ¹H NMR). Do mieszaniny wkraplano roztwór eterowy diazometanu do pH 7 w temperaturze 0°C i pozostawiono na noc. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika otrzymano 1,05g mieszaniny estrów produktów kwasów, które rozdzielono przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230-400mesh). Eluentem był układ rozpuszczalników:

heksan : AcOEt (5 : 1; 4 : 1, a następnie AcOEt). Uzyskano czystego produktu *cis*-**43** (365mg; 25%); $R_f = 0,27$ (układ D).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 2,77 (AB, 1H, CH_2); 3,18 (AB, 1H, CH_2); 3,68 (s, 1H, CH); 3,74 (s, 3H, OCH_3); 3,80 (s, 3H, OCH_3); 3,81 (s, 3H, OCH_3);

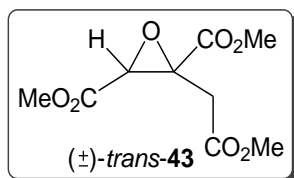
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 38,42; 52,64; 53,10; 53,41; 57,90; 59,43; 165,92; 167,18; 168,96.

4.10.2. Epoksyd *cis*-akonitynianu tripotasowego



Hydrolizę estrów metylowych epoksydu *cis*-akonitynianu trimetylu (**43**) (27,8mg; 0,12mmoli) przeprowadzono analogicznie do procedury otrzymywania (2*S*,3*R*)-3-allilójabłczanu dipotasowego (podrozdział 4.8.1). Używając trimetylosilanolan potasu (54mg; 0,39mmoli), uzyskano produkt **44** (29mg; 80%) w postaci żółtego krystalicznego proszku o $t_f > 180^\circ\text{C}$ (r).

4.10.3. Epoksyd *trans*-akonitynianu trimetylu



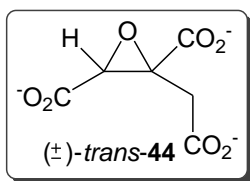
Metoda z zastosowaniem UHP

W kolbie kulistej (50ml) umieszczono *trans*-akonitynian trimetylu (**23**) (728mg; 3,37mmoli), DCC (1,39g; 6,74mmoli), UHP (3,8g; 40,44mmoli), KHCO_3 (675mg; 6,74mmola) i dodano 15ml bezwodnego metanolu. Roztwór mieszano przez kilkanaście godzin w temperaturze pokojowej. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 15ml H_2O i ekstrahowano eterem dietylowym ($3 \times 85\text{ml}$). Frakcje eterowe połączono i suszono nad bezwodnym MgSO_4 . Usunięto rozpuszczalnik uzyskując 650mg surowego produktu, który oczyszczano z zastosowaniem chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230–400mesh). Eluentem był układ rozpuszczalników: heksan : AcOEt (9 : 1). Otrzymano epoksydu *trans*-**43** (176mg; 13%) w postaci gęstego bezbarwnego oleju; $R_f = 0,83$ (układ B).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 3,14 (AB, 2H, CH_2); 3,74 (s, 3H, OCH_3); 3,82 (s, 3H, OCH_3); 3,85 (s, 3H, OCH_3); 3,95 (s, 1H, CH);

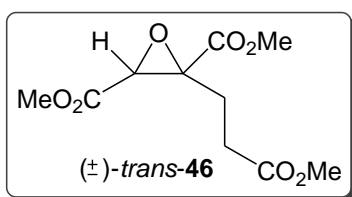
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 43,46; 51,92; 52,85; 52,93; 53,01; 60,03; 168,06; 170,12; 172,25.

4.10.4. Epoksyd *trans*-akonitynianu tripotasowego



Hydrolizę estrów metylowych epoksydu *trans*-akonitynianu trimetylu (**43**) (27,3mg; 0,12mmola) przeprowadzono analogicznie do procedury otrzymywania (2*S*,3*R*)-3-allilo-jabłczanu dipotasowego (podrozdział **4.8.1**). Używając trimetylosilanolan potasu (54mg; 0,39mmoli), uzyskano produkt *trans*-**44** (32mg; 87%) w postaci jasnobrązowego krystalicznego proszku o *t*_m > 180°C (r).

4.10.5. Epoksyd *trans*-homoakonitynianu trimetylu



Metoda z zastosowaniem H₂O₂ i kwasu wolframowego

Kwas *cis*-homoakonitynowy (530mg; 2,82mmoli) rozpuszczono w 7,5ml 1*N* NaOH, dodano kwas wolframowy (100mg; 0,4mmola) oraz 300μl 30% H₂O₂. Całość mieszano przez 2h w temperaturze 85°C. Następnie dodano 1ml 10*N* HCl i mieszaninę reakcyjną przelano do ekstraktora, w którym prowadzono ekstrakcję ciągłą ciecz-ciecz eterem dietylowym przez kilkanaście godzin. Z ekstraktu usunięto rozpuszczalnik, otrzymując 345mg jasnożółtego oleju, do którego wkraplano roztwór eterowy diazometanu do pH 7 w temperaturze 0°C i pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika otrzymano 440g surowego produktu, który oczyszczano z użyciem chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230-400mesh). Elucję prowadzono gradientowo układem rozpuszczalników: heksan : AcOEt (20 : 4; 20 : 5, a następnie sam AcOEt). Otrzymano produkt *trans*-**46** (232mg; 33,5%); R_f = 0,57 (układ B), który dalej oczyszczano z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Rozdział był wykonywany w układzie faz odwróconych.

Parametry	Wartość/rodzaj
Przedkolumna	Eclipse XDB-C18 4-Pack Analytical Guard Column 4,6×12.5mm 5-Micron
Kolumna chromatograficzna analityczna	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Analytical Column 4,6×150mm 5-Micron
Przygotowanie próbki	45mg rozpuszczono w 1,5ml układu: metanol/acetonytryl (1 : 1)
Objętość dozowanej próbki [μl]	20

Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej [ml/min]	1
Program elucji	izokratyczny
Skład fazy ruchomej	25% metanol
Temperatura [°C]	25
Długość fali [nm]	210,8
Referencja	wyłączona

Tabela 8. Warunki pracy chromatografu cieczowego HPLC z detektorem DAD.

¹H NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 2,39-2,33 (*m*, 1H, CH₂); 2,63-2,53 (*m*, 2H, CH₂); 2,75-2,67 (*m*, 1H, CH₂); 3,67 (*s*, 3H, OCH₃); 3,69 (*s*, 3H, OCH₃); 3,70 (*s*, 3H, OCH₃); 3,74 (*s*, 1H, CH);

¹³C NMR (CDCl₃) δ[ppm]: 31,57; 45,64; 52,19; 52,92; 52,97; 53,21; 60,05; 168,16; 170,82; 173,23.

4.11 Metody oznaczania aktywności biologicznej

Oznaczenie aktywności przeciwgrzybowej otrzymanych związków oraz testy hamowania aktywności wybranych enzymów szlaku kwasu α-aminoadypinowego wykonane zostały w laboratoriach Katedry Technologii Leków i Biochemii PG.

4.11.1 Określanie aktywności przeciwgrzybowej *in vitro*

Szcepki drobnoustrojów wykorzystywane dla określania aktywności przeciwgrzybowej

Gatunek	Oznaczenie szczepu
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Candida tropicalis</i>	KKP 334
<i>Candida glabrata</i>	DSM 11226
<i>Candida lusitaniae</i>	DSM 70102
<i>Candida krusei</i>	DSM 6128

Wszystkie szczepu pochodziły z kolekcji Katedry Technologii Leków i Biochemii. *Saccharomyces cerevisiae* jest jednym z najbardziej wykorzystywanych w nauce

organizmów. Są wygodnym materiałem do badań, ponieważ ich hodowla nie jest skomplikowana, mają niskie wymagania, a przy tym szybki wzrost. Szczepy grzybowe z rodzaju *Candida* stanowią florę fizjologiczną przewodu pokarmowego 40-80% populacji. Mogą również występować w narządach rodnych. Przy dobrze funkcjonującym układzie immunologicznym, nie stanowią one zagrożenia dla zdrowia człowieka. W przypadku osób z obniżoną odpornością, np.: w związku z chorobą nowotworową, terapią lekami immunosupresyjnymi, chemioterapią i radioterapią oraz antybiotykoterapią mogą wywoływać grzybice powierzchniowe i układowe, bardzo trudne do leczenia.

Podłoża wzrostowe

1. **YNB** 0,67% Yeast Nitrogen Base (Difco) + 2% *D*-glukoza
2. **YNB** buforowane 0.05 M MOPS, pH 7,0
3. **YEPG** 1% Yeast Extract (Difco) + 1% Bacto Peptone (Difco) + 2% *D*-glukoza
4. **RPMI** RPMI 1640 medium z *L*-glutaminą, bez węgla sodu, 25 g/l buforowane 0,05M MOPS, pH 7 + 2% *D*-glukoza

Podłoże YEPG przygotowano poprzez rozpuszczenie wymienionych powyżej składników w wodzie destylowanej i poddanie przygotowanego roztworu procesowi sterylizacji w autoklawie (121°C; 1,5atm.; 30min.).

Podłoże YNB przygotowano poprzez rozpuszczenie składnika podstawowego w minimalnej ilości wody destylowanej i sterylizację otrzymanego roztworu w wyniku przepuszczenia przez sterylny filtr membranowy (Millipore, Millex-GV; 0,22µm). Otrzymany sterylny roztwór łączono w odpowiedniej proporcji z 2% roztworem glukozy wysterylizowanym uprzednio w autoklawie (121°C; 1,5atm.; 30min.).

Podłoża RPMI i YNB buforowane przygotowano poprzez rozpuszczenie odpowiedniego składnika podstawowego w minimalnej ilości wody destylowanej, doprowadzano roztwór do pH 3 za pomocą 10mM HCl. Następnie dodano MOPS i doprowadzano roztwór do pH 7. Otrzymany sterylny roztwór łączono w odpowiedniej proporcji z 2% roztworem glukozy wysterylizowanym uprzednio w autoklawie (121°C; 1,5atm.; 30min.).

W razie potrzeby, dodawano do odpowiedniego podłoża sterylny roztwór *L*-lizyny, do uzyskania końcowego stężenia 50mM.

Oznaczanie aktywności przeciwgrzybowej in vitro metodą seryjnych rozcieńczeń w mikropłytkach

Oznaczanie aktywności przeciwgrzybowej otrzymanych związków wykonano metodą seryjnych rozcieńczeń w 96-studzienkowych mikropłytkach w podłożach płynnych, których składy podano powyżej.

Podłoże zaszczipiano komórkami badanych mikroorganizmów grzybowych i inkubowano przez 24h w temperaturze 30°C. Następnie przy użyciu podłoża np. YEPG ustalano gęstość optyczną $OD_{660} = 0,1$ (gęstość optyczna mierzona przy długości fali 660 nm), co opowiada 10^6 komórek w 1ml inokulum. Przygotowaną zawiesinę komórek rozcieńczano odpowiednim podłożem w stosunku 1 : 50, ażeby uzyskać gęstość 2×10^4 komórek/ml.

Otrzymywane inokulum dodawano w ilości 50µl do studzienek, wypełnionych uprzednio seryjnie rozcieńczonymi roztworami badanego związku w odpowiednim podłożu (50µl).

Seryjne rozcieńczenia wykonano w 10 spośród 12 studzienek w danym rzędzie mikropłytki. Końcowa objętość w każdej studzience mikropłytki wynosiła 100µl. Ostatnia studzienka stanowiła kontrolę wzrostu komórek w danej pożywce (czyste podłoże + inokulum). Przedostatnia studzienka zawierała wyłącznie pożywkę i stanowiła kontrolę czystości podłoża. Po zaszczipieniu, płytki były inkubowane 24h w temperaturze 30°C.

Analizę wyników wykonano z zastosowaniem czytnika mikropłytek Victor³ Perkin Elmer będącego wyposażeniem laboratorium badawczego Centrum Doskonałości „ChemBioFarm”. Wyznaczano wartości MIC definiowane jako najniższe stężenie związku powodujące zahamowanie wzrostu komórek, co najmniej 80%, w stosunku do kontroli wzrostu (co najmniej 80% obniżenie OD_{531} w stosunku do kontroli).

4.11.2 Otrzymywanie preparatów enzymatycznych i określanie stopnia hamowania aktywności enzymów przez badane związki

Izoenzymy syntazy homocytrynianowej z *Candida albicans* w formie białek fuzyjnych z fragmentem heksahistydylowym na N-końcu łańcucha polipeptydowego – Lys21-N-Hisp i Lys22-N-Hisp – izolowano i oczyszczano do stanu bliskiego homogenności z rekombinowanych komórek *E. coli* BL21(DE3) pLysS Lys21-N-His i

BL21(DE3) pLysS Lys22-N-His, wg metodyki opracowanej przez Kur i Milewskiego.^{117,118}

Homoakoniatazę z *Candida albicans* w formie białka rekombinowanego (brak C-końcowej sekwencji sygnałnej kierującej do mitochondrium, fragment heksahistydylowy na N-końcu) wytwarzano w komórkach *E. coli* BL21(DE3) pLysS Lys4ds-N-His, a następnie otrzymywano ekstrakt bezkomórkowy, w którym oznaczano aktywność enzymu, wg metodyki opracowanej przez K. Kur.¹¹⁷

Dehydrogenazę homoizocytrynianową z *Candida albicans* w formie białka fuzyjnego z fragmentem heksahistydylowym na N-końcu łańcucha polipeptydowego izolowano i oczyszczano do stanu bliskiego homogenności z rekombinowanych komórek *E. coli* BL21(DE3) transformowanych plazmidem pET23b-LYS6-N-His wg metodyki opracowanej przez Gabriel i in.¹¹⁹

Aktywność syntazy homocytrynianowej oznaczano za pomocą metody Jaklitsch i Kubicek,¹²⁰ w której mierzy się ilość powstającego w reakcji koenzymu A z użyciem kwasu 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowego (DTNB).

Aktywność homoakoniatazy oznaczano wg dwóch alternatywnych procedur: (1) metodą bezpośrednią Strassman'a i Ceci¹²¹ oraz (2) metodą pośrednią, w reakcji sprzężonej z dehydrogenazą homoizocytrynianową.

Aktywność dehydrogenazy homoizocytrynianowej oznaczano wg metody opisanej przez Lin i in.¹²²

Jako miarę zdolności badanych związków do hamowania aktywności enzymatycznej, wyznaczano wartości IC₅₀, tj. stężeń powodujących zahamowanie aktywności danego enzymu w 50% w stosunku do kontroli. Wartości IC₅₀ wyznaczano z krzywych zależności: % zahamowania aktywności w funkcji stężenia inhibitora.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Głównym celem prezentowanej rozprawy było zaprojektowanie struktur, opracowanie metod syntezy i otrzymanie szeregu nowych lub znanych związków – potencjalnych inhibitorów enzymów szlaku biosyntezy *L*-lizyny. Realizacja tak postawionego celu wymagała, po pierwsze – zaplanowania struktur związków w oparciu o dostępną literaturę i ogólne założenia konstrukcji inhibitorów enzymatycznych i opracowania warunków ich syntezy oraz po drugie - określenia aktywności otrzymanych związków jako inhibitorów enzymatycznych i fungicydów.

Podsumowując wyniki badań, które wykonałam i opisałam w ramach niniejszej rozprawy mogę stwierdzić, że:

- 1) Opracowałam alternatywną do znanych z literatury procedur metodę wieloetapowej syntezy optycznie czystych enancjomerów kwasu homocytrynowego. Związek ten był niezbędny do przeprowadzenia badań biochemicznych oraz jako istotny substrat do otrzymania *cis*- i *trans*-homoakonitynianu trimetylu;
- 2) Zaproponowałam oryginalną metodę syntezy *cis*-homoakonitynianu trimetylu;
- 3) W wyniku modyfikacji opisanej w literaturze metody otrzymałam z dobrą wydajnością kwas (2*R*,3*S*)-homoizocytrynowy ($[\alpha]_D$ -11 (*c*1,54; aceton)), jako substrat do badań biochemicznych oraz syntez chemicznych;
- 4) Przeprowadziłam efektywną syntezę α -difluorometylolizyny (DFML) – homologu znanego inhibitora enzymatycznego α -difluorometyloornityny (DFMO);
- 5) Zaprojektowałam i otrzymałam pochodne kwasów dikarboksylowych, zawierające w swojej budowie atom fluoru lub grupę hydroksylową, a mianowicie: (2*S*,3*R*)-3-allilójabłczan dimetylu, (2*S*,3*R*)-3-propylojabłczan dimetylu, (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-propylobursztynianu dimetylu i (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-propylobursztynianu dimetylu. Są to związki będące analogami kwasu homoizocytrynowego o charakterze potencjalnych inhibitorów dehydrogenazy homoizocytrynianowej. Wszystkie uzyskane pochodne przekształciłam w sole potasowe z zastosowaniem trimetylosilanolanu potasu;
- 6) Związki: *trans*-akonitynian trimetylu, *trans*- i *cis*-homoakonitynian trimetylu przekształciłam w ich pochodne epoksydowe na drodze dwóch różnych metod utleniania wiązania podwójnego: przy użyciu kompleksu UHP oraz nadtlaniem wodoru w obecności kwasu wolframowego. Uzyskane pochodne przeprowadziłam

w ich sole potasowe z zastosowaniem trimetylosilanolanu potasu. Ze względu na obecność w swojej cząsteczce pierścienia epoksydowego są to związki wysoce reaktywne i mogą oddziaływać między innymi z grupami hydroksylowymi, tiolowymi bądź aminowymi reszt aminokwasowych, wchodzących w skład struktury enzymu;

- 7) W oparciu o informacje literaturowe na temat wprowadzania atomu fluoru do cząsteczki związku organicznego, opracowałam metodę wymiany grupy hydroksylowej w cytrynianie trimetylu i w innych analogicznych związkach na atom fluoru w reakcji nukleofilowego podstawienia z zastosowaniem odczynnika fluorującego DAST; reakcja przebiegała jednoetapowo i prowadziła do równoległego powstania trwalszych termodynamicznie produktów eliminacji.

Ponadto w ramach prac rozpoznawczych przebadalam następujące możliwości:

- 1) Przeprowadzenia reakcji fluorowania z wykorzystaniem reagentów fluorujących: TBAF oraz KF, w których wymianie na atom fluoru powinien ulegać atom bromu, znajdujący się w cząsteczce związku; podczas reakcji, zamiast substytucji nukleofilowej obserwowałam proces epimeryzacji – wzajemne przechodzenie jednego diastereoizomeru bromoanalogu w drugi;
- 2) Przeprowadzenia reakcji addycji elektrofilowej HF/pirydyna do wiązania podwójnego *trans*-akonitynianu trimetylu oraz Selectfluoru do karboanionu, powstającego z malonianu dietylu lub metylenocytrynianu dimetylu.

Dla otrzymanych przeze mnie związków przeprowadzono badania aktywności biologicznej w Katedrze Technologii Leków i Biochemii (KTLiB). Na podstawie uzyskanych wyników można sformułować następujące wnioski:

- 1) Oznaczenia aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* postaci estrowych otrzymanych związków wykonane na modelu sześciu referencyjnych szczepów grzybowych: *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* oraz *C. krusei* wykazały, że większość badanych estrów w stężeniach <512 µg/ml nie hamuje wzrostu drobnoustrojów grzybowych. Nieznaczną aktywność przeciwgrzybową stwierdzono dla (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-allylobursztynianu dimetylu oraz (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-butylobursztynianu dimetylu (MIC = 256-512 µg/ml), natomiast znaczącą aktywnością wykazał się *trans*-homoakonitynian trimetylu. Dla związku tego wyznaczono wartości MIC rzędu 16-32 µg/ml w pożywce RPMI-1640, o składzie zbliżonym do warunków fizjologicznych występujących w zainfekowanym

organizmie. Należy zauważyć, że wartości MIC tego związku w podłożu minimalnym YNB były nieco wyższe, a obecność *L*-lizyny w podłożu nie wpływała efekt grzybostatyczny, co może wskazywać na inny niż szlak biosyntezy lizyny, cel molekularny tego związku. Z drugiej strony, nie można jednak wykluczyć, że celem molekularnym jest np. homoakonitaza, a przyczyna braku efektu odwracania hamowania aktywności przez lizynę jest inna, niż może się to wydawać. Badania nad mechanizmem działania biologicznego *trans*-homoakonitynianu trimetylu będą kontynuowane w KTLiB PG w celu wyjaśnienia tych wątpliwości;

- 2) Oznaczenia zdolności inhibicyjnej związków otrzymanych w postaci soli wobec dwóch enzymów szlaku biosyntezy lizyny, syntazy homocytrynianowej i dehydrogenazy homoizocytrynianowej, wykazały efekt hamowania aktywności pierwszego z w/w enzymów przez DFML i sól dipotasową kwasu (*2R,3R*)-2-fluoro-3-allilobursztynowego, oraz nieznaczny wpływ większości badanych związków na aktywność dehydrogenazy homoizocytrynianowej. W szczególności stwierdzono, że:
 - a) DFML hamuje aktywność izoenzymu Lys22p syntazy homocytrynianowej ($IC_{40} = 4,2mM$) nie wywierając jednocześnie widocznego wpływu na aktywność drugiej izoformy tego enzymu, Lys21p. Można przypuszczać, że DFML wiąże się z enzymem w miejscu wiązania fizjologicznego inhibitora, jakim jest *L*-lizyna. Ponieważ badana DFML otrzymana została przeze mnie w postaci mieszaniny racemicznej, dość prawdopodobne jest, że potencjał inhibicyjny rzeczywiście aktywnego enancjomeru *L* będzie większy, niż mieszaniny racemicznej;
 - b) Obserwowano zahamowanie aktywności, zarówno syntazy homocytrynianowej ($IC_{10} = 2,5mM$ dla Lys21-N-Hisp; $IC_{20} = 4,2mM$ dla Lys22-N-Hisp), jak i dehydrogenazy homoizocytrynianowej (15% inhibicja przy stężeniu 5 mM), przez sól dipotasową kwasu (*2R,3R*)-2-fluoro-3-allilobursztynowego. Przypuszczalnie pierwszy z obserwowanych efektów może być spowodowany podobieństwem strukturalnym związku do produktu reakcji katalizowanej przez syntazę homocytrynianową, natomiast drugi – podobieństwem do substratu reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę. Warto jednak zwrócić uwagę, że konfiguracja centrum asymetrii na atomie węgla C3 w badanym związku jest inna, niż w naturalnym kwasie homoizocytrynowym, co może być przyczyną stosunkowo słabej aktywności inhibicyjnej badanego związku wobec dehydrogenazy;

- c) Umiarkowany efekt inhibicyjny wobec dehydrogenazy homoizocytynianowej stwierdzono dla soli dipotasowych kwasów (2*S*,3*R*)-3-propylojabłkowego, (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-propylo-bursztynowego oraz (2*S*,3*R*)-3-allilobjabłkowego (hamowanie aktywności odpowiednio 36%, 20% oraz 37%, przy stężeniu 5*mM*). Wszystkie te związki mogą być uważane za analogi substratu, różniące się jednak od niego konfiguracją centrów asymetrii. Różnice te mogą być przyczyną niezbyt wysokiego potencjału inhibicyjnego;
- d) Stosunkowo słabe hamowanie aktywności dehydrogenazy homoizocytynianowej przez sole pochodnych epoksydowych kwasu akonitynowego (26% dla formy *cis* i 38%, dla formy *trans* przy stężeniu 5*mM*) oraz przez sól tripotasową kwasu *trans*-homoakonitynowego (16% przy 5*mM*) można tłumaczyć raczej odległą analogią strukturalną do substratu tego enzymu;
- e) Z uwagi na brak możliwości uzyskania aktywnego preparatu oczyszczonej homoakonitazy niemożliwe było przeprowadzenie badań potencjału inhibicyjnego otrzymanych przez mnie związków wobec tego enzymu. Badania takie zostaną przeprowadzone w przyszłości i można mieć nadzieję, że przynajmniej niektóre z tych związków okażą się dość skutecznymi inhibitorami homoakonitazy.

SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Reakcja antybiotyku E-64 z grupą tiolową w centrum katalitycznym proteinazy cysteinowej papainy.....	14
Rysunek 2. Mechanizm inaktywacji dekarboksylazy ornitynowej przez DFMO.	15
Rysunek 3. Zasada działania boronowych inhibitorów enzymów proteolitycznych.	16
Rysunek 4. Szlak kwasu α -aminoadypinowego biosyntezy lizyny u grzybów wyższych.....	24
Rysunek 5. Potencjalne inhibitory dehydrogenazy sacharopiny.	26
Rysunek 6. Reakcja oksydatywnej dekarboksylacji katalizowana przez HICDH.....	27
Rysunek 7. Proponowany mechanizm reakcji zachodzącej w obecności inhibitorów HICDH..	28
Rysunek 8. Reakcja katalizowana przez HICDH z substratami, zawierającymi heteroatom w swojej cząsteczce.	29
Rysunek 9. Metoda otrzymywania (<i>R</i>)-homocytrynianu trisodowego z kwasu <i>D</i> -jabłkowego..	31
Rysunek 10. Synteza optycznie czynnego estru trimetylowego kwasu homocytrynowego, wykorzystująca kwas chinowy jako substrat.	32
Rysunek 11. Utlenianie kwasu (–)-chinowego do kwasu homocytrynowego.....	33
Rysunek 12. Metoda syntezy kwasu homocytrynowego z malonianu monoetylu.	34
Rysunek 13. Strategia syntezy γ -laktonu kwasu (<i>S</i>)-homocytrynowego, biorąca początek z (<i>S</i>)-fenyloalaniny.	35
Rysunek 14. Strategia syntezy γ -laktonu kwasu (<i>R</i>)-(–)-homocytrynowego z kwasu metylenocytrynowego.....	36
Rysunek 15. Metoda syntezy γ -laktonu racemicznego kwasu homocytrynowego, wykorzystująca jako substrat kwas α -ketoglutazarowy.	37
Rysunek 16. Metoda otrzymywania γ -laktonu kwasu (<i>R</i>)-homocytrynowego z morfolin-2,3-dionu.	38
Rysunek 17. Metoda syntezy laktonu kwasu (<i>S</i>)-homocytrynowego i laktonu kwasu (<i>R</i>)-perhomocytrynowego.	39
Rysunek 18. Synteza i rozdział optycznie czynnych izomerów kwasu homoizocytrynowego. .	41
Rysunek 19. Synteza kwasu (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-homoizocytrynowego XXXVIII i jego triestru metylowego CXX	42
Rysunek 20. Schemat wieloetapowej syntezy homocytrynianu trisodowego (–)- 9	48
Rysunek 21. Strategia syntezy kwasu (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-homoizocytrynowego i jego estru metylowego 20	52
Rysunek 22. Uproszczony mechanizm reakcji deoksyfluorowania z zastosowaniem DAST	57
Rysunek 23. Otrzymywanie 2-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylanu trimetylu (22).....	58
Rysunek 24. Widmo ¹⁹ F NMR 2-fluoro-1,2,3-propanotrikarboksylanu trimetylu (rozp. CDCl ₃).....	59

Rysunek 25. Synteza <i>cis</i> - i <i>trans</i> -homoakonitynianu trimetylu.	60
Rysunek 26. Widma ¹ H NMR <i>cis</i> - i <i>trans</i> -homoakonitynianów trimetylu.	61
Rysunek 27. Strategia syntezy 2-fluorodeoksyhomoizocytrynianu trimetylu.	62
Rysunek 28. Widmo ¹⁹ F NMR 2-fluoro-3-allilobursztynian dimetylu.	62
Rysunek 29. Strategia syntezy 2-fluorometylenocytrynianu dimetylu.	64
Rysunek 30. Strategia syntezy estru dimetylowego laktonu kwasu fluorohomocytrynowego...	66
Rysunek 31. Reakcje fluorowania z Selectfluorem.	67
Rysunek 32. Struktury kwasów dikarboksylowych - potencjalnych inhibitorów dehydrogenazy homoizocytrynianu	69
Rysunek 33. Synteza kwasów dikarboksylowych - analogów kwasu homoizocytrynowego.....	70
Rysunek 34. Schemat syntezy 2-difluorometylolizyny.	72
Rysunek 35. Widmo ¹⁹ F NMR dichlorowodoru estru metylowego 2-difluorometylolizyny (rozp. CD ₃ OD).	73
Rysunek 36. Synteza pochodnej epoksydowej kwasu <i>trans</i> -akonitynowego.....	75
Rysunek 37. Synteza pochodnej epoksydowej kwasu <i>cis</i> -akonitynowego.	76
Rysunek 38. Synteza epoksydu <i>trans</i> -homoakonitynianu trimetylu.	77

SPIS TABEL

Tabela 1. Zestawienie niektórych leków fluorowanych stosowanych w medycynie.	22
Tabela 2. Stałe inhibicji kompetytywnej omawianych związków.	28
Tabela 3. Stałe kinetyczne aktywności HICDH dla badanych związków:	30
Tabela 4. Wyniki oznaczania aktywności przeciwgrzybowej otrzymanych związków w podłożu YNB.	78
Tabela 5. Aktywność przeciwgrzybowa <i>trans</i> -homoakonitynianu trimetylu w różnych podłożach.	79
Tabela 6. Inhibicja aktywności enzymów dla badanych związków;	80
Tabela 7. Warunki pracy preparatywnego chromatografu cieczowego HPLC z detektorem DAD.	97
Tabela 8. Warunki pracy chromatografu cieczowego HPLC z detektorem DAD.	111

WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

Publikacje oryginalne z listy filadelfijskiej:

Prokop, M., Milewska, M. J.; An Improved Synthesis of Trisodium (*R*)-Homocitrate from Citric Acid, *Polish J. Chem.*, **2009**, 83, 1317;

Prokop, M., Czarnecka, J., Milewska, M. J.; *N'*-Alkyl Derivatives of L-Glutamine as Inhibitors of Glutamine – Utilizing Enzymes, *Z. Naturforsch.*, **2009**, 64c, 631;

Komunikaty z konferencji międzynarodowych:

Prokop, M., Milewska, M. J.; *Synthesis of N'-alkyl Derivatives of Glutamine – Potential Inhibitors of Glucosamine-6-phosphate Synthase*; ESOR XI, 11TH EUROPEAN SYMPOSIUM ON ORGANIC REACTIVITY, Faro, Portugal, 1-6 July 2007, PP67;

Czarnecka, J., **Prokop, M.**, Milewski, S.; *Alternative substrates for glucosamine-6-phosphate synthase*; 2ND EUROPEAN CONFERENCE ON CHEMISTRY FOR LIFE SCIENCES, Wrocław, Poland, 4-8 September 2007, 153;

Prokop, M., Milewska, M. J.; *Alternative Method of Synthesis of Optically Active Homocitric Acid*; 11TH BELGIAN ORGANIC SYNTHESIS SYMPOSIUM, Ghent, Belgium, 13-18 July 2008, PP290;

Czarnecka, J., Wojciechowski, M., **Prokop, M.**, Milewski, S., *Application od glucosamine-6-phosphate synthase for the formation of D-glucosamine derivatives*, INTERNATIONAL ENZYME ENGINEERING SYMPOSIUM, Kusadasi, Turkey, 1 – 5 October 2008;

Gabriel, I., Szweda, P., Kur, K., **Prokop, M.**, Milewska, M., Milewski, S., *Enzymes of the lysine biosynthetic pathway as targets for antifungals*, 35TH FEBS CONGRESS, Gothenburg, Sweden, 26 June – 1 July 2010; FEBS Journal – Vol. 277, suppl. 1;

Komunikaty ustne w ramach corocznej Sesji Sprawozdawczej Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej:

Prokop, M., *Synteza potencjalnych inhibitorów enzymatycznych. I. Synteza N-alkilowych pochodnych glutaminy*, Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej: materiały, Gdańsk, 24-25.09.2007, 58;

Prokop, M., *Synteza potencjalnych inhibitorów enzymatycznych. II. Synteza optycznie czynnego kwasu homocytrynowego*, Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej: materiały, Gdańsk, 22-23.09.2008, 54;

Prokop, M., *Synteza potencjalnych inhibitorów enzymatycznych. III. Synteza fluoropochodnych kwasu homocytrynowego i cytrynowego*, Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej: materiały, Gdańsk, 21-22.09.2009, 63;

Stypendia:

Stypendium naukowe w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” na rok akademicki 2009/2010; (Projekt: POKL.04.01.01-00-368/09).

Badania, których wyniki opisano w rozprawie były częściowo finansowane przez MNiSzW w ramach grantu NN405 3850 33.

SUMMARY

Several new compounds of potential biological activity resulting from inhibition of enzymes of the *L*-lysine biosynthetic pathway in fungal cells have been designed and synthesised, including: a) citric acid derivatives: 3-fluoro-3-deoxycitrate, *trans*-aconitate and its epoxide derivative; b) homocitric and homoisocitric acid and their derivatives including *cis*- and *trans*-homoaconitate and their epoxides, (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-methoxycarbonyl-hexanedioic acid 1-methyl ester as well as dicarboxylic derivatives with alkyl substituents of different character. Selection of the mentioned compounds as potential enzyme inhibitors was based on thorough analysis of hitherto existing knowledge about structures of the active sites, substrate spectrum and mechanisms of reactions catalyzed by the enzymes of the α -aminoadipate pathway, structural analogy to the well known inhibitors of enzymes catalyzing metabolic reactions similar to the particular steps of lysine biosynthesis pathway and finally on the general rules of enzyme inhibitors design.

Fluorodeoxy derivatives were obtained with the use of DAST as a fluorinating agent, allowing substitution of the hydroxyl group by fluorine. A few other methods of fluorine introduction to obtain homocitrate and homoisocitrate derivatives were tested, demonstrating severe limitations. Epoxy derivatives of aconitic and homoaconitic acid were prepared using the UHP methodology and treatment with hydrogen peroxide in the presence of tungstic acid. A lysine analogue, α -difluoromethyllysine (DFML) was synthesised due to the introduction of the difluoromethyl group deriving from chlorodifluoromethane to the α -carbon atom of *L*-lysine.

The above mentioned compounds were synthesised as free acids and esters. It was anticipated that the esters should better diffuse across a biological membrane and then be hydrolysed intracellularly by esterases to release actual enzyme inhibitors.

The ester compounds were tested for antifungal *in vitro* activity against a few fungal strains. Most of them lacked antifungal activity, while (2*R*,3*R*)-3-fluoro-2-allylsuccinic acid dimethyl ester and (2*R*,3*R*)-3-fluoro-2-butylsuccinic acid dimethyl ester exhibited some minor fungistatic effect against two strains. Definitely the best antifungal properties were found for trimethyl *trans*-homoaconitate which at concentration 16-32 μ g/ml inhibited growth of all fungal strains in the medium mimicking physiological conditions. Free acid/salt compounds were tested for their inhibitory potency towards

two enzymes of the α -aminoadipate pathway. DFML was inhibitory for the Lys22p isoenzyme of homocitrate synthase ($IC_{40} = 4.2mM$), having no effect on activity of another isoenzyme, Lys21p. Inhibition of both homocitrate synthase ($IC_{10} = 2.5mM$ for Lys21p; $IC_{20} = 4.2mM$ for Lys22p) and homoisocitrate dehydrogenase (15% inhibition at $5mM$) was observed for dipotassium (2*R*,3*R*)-3-fluoro-2-allylsuccinate. Finally, 16-37% inhibition of homoisocitrate dehydrogenase was noted for epoxide derivatives of aconitate, (2*S*,3*R*)-3-propylmalate, (2*R*,3*R*)-2-fluoro-3-propylsuccinate, (2*S*,3*R*)-3-allylmalate and *trans*-homoaconitate, at $5mM$.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Breyer-Pfaff, U., Maier, U., Brinkmann, A. M., Schumm, F., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1985**, 37, 495;
- ² Girisha, H. R., Narendra Sharath Chandra, J. N., Boppana, S., Malviya, M., Sadashiva, C. T., Rangappa, K. S., *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44, 4057;
- ³ Rajagopalan, P. T., Zhang, Z., McCourt, L., Dwyer, M., Benkovic, S. J., Hammes, G. G., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2002**, 99, 13481;
- ⁴ Sreedharan, S. K., Verma, C., Caves, L. S. D., Brocklehurst, S. M., Gharbia, S. E., Shah, H. N., Brocklehurst, K., *Bioch. J.*, **1996**, 316, 777;
- ⁵ Miesowicz, F.M., Bloch, K., *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 5868;
- ⁶ Saydjari, R., Townsend, C. M., Barranco, S. C., Thompson, J. C., *Dig. Dis. Sci.*, **1989**, 34, 1629;
- ⁷ Poulin, R., Lu, L., Ackermann, B., Bey, P., Pegg, A. E., *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 150;
- ⁸ Pegg, A. E., *Cancer Res.*, **1988**, 48, 759;
- ⁹ Jabbour, A., Smoum, R., Takroui, K., Shalom, E., Zaks, B., Steinberg, D., Rubinstein, A., Goldberg, I., Katzhendler, J., Srebrnik, M., *Pure Appl. Chem.*, **2006**, 78, 1425;
- ¹⁰ Furie, B., Furie, B. C., *Cell.*, **1988**, 53, 505;
- ¹¹ Bachovchin, W. W., Wong, W. Y. L., Farr-Jones, S., Shenvi, A. B., Kettner, C. A., *Biochemistry*, **1988**, 27, 7689;
- ¹² Tsilikouras, E., Kettner, C. A., Bachouvchin, W. W., *Biochemistry*, **1992**, 31, 12839;
- ¹³ Suda, H., Aoyagi, t., Takeuchi, T., Umezawa, H., *J. Antibiot.*, **1973**, 26, 621;
- ¹⁴ Kam, C. M., Nishino, N., Powers, J. C., *Biochemistry*, **1979**, 18, 3032;
- ¹⁵ Izquierdo-Martin, M., Stein, R. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992** 114, 325;
- ¹⁶ Williams, B., *Am. J. Cardiol.*, **2001**, 87, 10C;
- ¹⁷ Hammoud, R. A., Vaccari, C. S., Nagamia, S. H., Khan, B. V., *Vasc. Health Risk Manag.*, **2007**, 3, 937;
- ¹⁸ Fabris, B., Chen, B. Z., Pupic, V., Perich, R., Johnston, C. I., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1990**, 15, S6;
- ¹⁹ Kirk, K. L., *J. Fluor. Chem.*, **2006**, 127, 1013;
- ²⁰ Gerstenberger, M. R. C., Haas, A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1981**, 20, 647;
- ²¹ Fanshier, D. W., Gottwald, L. K., Kun, E., *J. Biol. Chem.*, **1964**, 239, 425;
- ²² Böhm, H. J., Banner, D., Bendels, S., Kansy, M., Kuhn, B., Müller, K., Obst-Sander, U., Stahl, M., *Chem. Biochem.*, **2004**, 5, 637;
- ²³ Dolbier, W. R. Jr., *J. Fluorine Chem.*, **2005**, 126, 157;
- ²⁴ Begue, J. P.; Bonnet-Delpon, D., *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, **2008**, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken;

-
- ²⁵ Isanbor, C., O'Hagan, D., *J. Fluorine Chem.*, **2006**, *127*, 303;
- ²⁶ Singh, R. P., Shreeve, J. M., *Synthesis*, **2002**, *17*, 2561;
- ²⁷ White, J. R., *Clin. Diab.*, **2008**, *26*, 53;
- ²⁸ Oikonomakos, N. G., Zographos, S. E., Skamnaki, G., *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 1313;
- ²⁹ Steuber, H., Zentgraf, M., Podjarny, A., Heine, A., Klebe, G., *J. Mol. Biol.*, **2006**, *356*, 45;
- ³⁰ Baumann, K. L., Butler, D. E., Deering, C. F., Mennenm K. E., Millar, A., Nanninga, T. N., Palmer, C. W., Roth, B. D., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 2283;
- ³¹ McTaggart, F., Buckett, L., Davidson, R., Holdgate, G., McCormick, A., Schneck, D., Smith, G., Warwick, M., *Am. J. Cardiol.*, **2001**, *87*, (suppl.), 28B;
- ³² Quann, M. L., Lam, P. Y. S., Han, Q., Pinto, D. J. P., He, M. Y., Li, R., Ellis, C. D., Clark, C. G., Teleha, C. A., Sun, J. H., Alexander, R. S., Bai, S., Muettgen, J. M., Knabb, R. M., Wong, P. C., Wexler, R. R., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 1729;
- ³³ Kohrt, J. T., Filipski, K. J., Cody, W. L., Cai, C., Dudley, D. A., Van Huis, C. A., Willardsen, J. A., Narasimhan, L. S., Zhang, E., Rapundalo, S. T., Saiya-Cork, K., Leadley, R. J., Edmunds, J. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 1060;
- ³⁴ Drlica, K., Zhao, X., *Mol. Biol. Rev.*, **1997**, *61*, 377;
- ³⁵ Yun, H. J., Min, Y. H., Jo, Y. W., Shim, M. J., Choi, E. C., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2005**, *25*, 334;
- ³⁶ Blondeau, J. M., Missaghi, B., *Expert Opin. Pharmacother.*, **2004**, *5*, 1117;
- ³⁷ Barbachyn, M. R., Ford, C. W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 2010;
- ³⁸ Mađry, K., *Współcz. Onkol.*, **2004**, *8*, 52;
- ³⁹ Foss, F. M., *Best Pract. Res. Clin. Hematol.*, **2004**, *17*, 573;
- ⁴⁰ Sabo, J. A., Abdel-Rahman, S. M., *Ann. Pharmacotherapy*, **2000**, *34*, 1032;
- ⁴¹ Warn, P. A., Sharp, A., Denning, D. W., *J. Antimicrob. Chemother.*, **2006**, *57*, 135;
- ⁴² Patterson, T. F., *Lancet*, **2005**, *366*, 1013;
- ⁴³ Pfaller, M. A., *J. Hosp. Infect.*, **1995**, *30*, 329;
- ⁴⁴ Pfaller, M. A., Messer, S. A., Houston, A., Rangel-Frausto, M. S., Wiblin, T., Blumberg, H. M., Edwards, J. E., Jarvis, W., Martin, M. A., Neu, H. C., Saiman, L., Patterson, J. E., Dibb, J. C., Roldan, C. M., Rinaldi, M. G., Wenzel, R. P., *Diagn. Microbol. Infect. Dis.*, **1998**, *31*, 289;
- ⁴⁵ Paluszewska, M., *Współcz. Onkol.*, **2004**, *8*, 58;
- ⁴⁶ Zabriskie, T. M., Jackson, M. D., *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, *17*, 85;
- ⁴⁷ Palmer, D. J., Balogh, H., Ma, G., Zhou, X., Marko, S. G., Kaminskyj, S., W., *Pharmazie*, **2004**, *59*, 93;
- ⁴⁸ Yamamoto, T., Miyazaki, K., Eguchi, T., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 1346;
- ⁴⁹ Yamamoto, T., Eguchi, T., *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 3372;

-
- ⁵⁰ Strassman, M., Ceci, L. N., *J. Biol. Chem.*, **1965**, *240*, 4357;
- ⁵¹ Ma, G., Palmer, D. R. J., *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 9209;
- ⁵² Tavassoli, A., Duffy, J. E. S., Young, D. W., *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 569;
- ⁵³ Thomas, U., Kalyanpur, M. G., Stevens, C. M., *Biochemistry*, **1966**, *5*, 2513;
- ⁵⁴ Li, Z. C., Xu, J. Q., *Molecules*, **1998**, *3*, 31;
- ⁵⁵ Huang, P. Q., Li, Z. Y., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 3367;
- ⁵⁶ Seebach, D., Sting, A. R., Hoffmann, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, *35*, 2708;
- ⁵⁷ Wunsch, B., Zott, M., *Liebigs Ann. Chem.*, **1992**, 39;
- ⁵⁸ Seebach, D., Naef, R., Calderari, G., *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 1313;
- ⁵⁹ Xu, P. F., Matsumoto, T., Ohki, Y., Tatsumi, K., *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 3815;
- ⁶⁰ Ancliff, R. A., Russell, A. T., Sanderson, A. J., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 3379;
- ⁶¹ Chen, H. B., Chen, L. Y., Huang, P. Q., Zhang, H. K., Zhou, Z. H., Tsai, K. R., *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 2148;
- ⁶² Singh, P., Mittal, A., Kaur, P., Kumar, S., *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 1063;
- ⁶³ Pansare, S. V., Adsool, V. A., *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 7099;
- ⁶⁴ Pansare, S. V., Adsool, V. A., Dyapa, R., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, *21*, 771;
- ⁶⁵ Gorobets, E. V., Miftakhov, M. S., Valeev, F. A., *Russ. Chem. Rev.*, **2000**, *69*, 1001;
- ⁶⁶ Yamashita, M., *J. Org. Chem.*, **1958**, *23*, 835;
- ⁶⁷ Chilina, K., Thomas, U., Tucci, A. F., McMichael, K. D., Stevens, C. M., *Biochemistry*, **1969**, *8*, 2846;
- ⁶⁸ Schmitz, C., Rouanet - Dreyfuss, A. C., Tueni, M., Biellmann, J. F., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 4911;
- ⁶⁹ Schmitz, C., Rouanet - Dreyfuss, A. C., Tueni, M., Biellmann, J. F., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 1817;
- ⁷⁰ Clarke, D. D., *Neurochem. Res.*, **1991**, *16*, 1055-1058;
- ⁷¹ Suvarna, K., Seah, L., Bhattacharjee, V., Bhattacharjee, J. K., *Curr. Genet.*, **1998**, *33*, 268;
- ⁷² Milewska, M. J., Połośki, T., *Synthesis*, **1988**, 475;
- ⁷³ Nau, C. A., Brown, E. B., Bailey, J. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1925**, *47*, 2596;
- ⁷⁴ Weygand, F., Bestmann, H. J., *Angew. Chem.*, **1960**, *72*, 535;
- ⁷⁵ Guichard, G., Abele, S., Seebach, D., *Helv. Chim. Acta*, **1998**, *81*, 187;
- ⁷⁶ Franzen, V., Katonah, Z., *Chem. Ztg.*, **1957**, *81*, 359;
- ⁷⁷ Wilds, A. L., Meader, A. L., *J. Org. Chem.*, **1948**, *13*, 763;
- ⁷⁸ Lal, G. S., Pez, G. P., Pesaresi, R. J., Prozonc, F. M., Cheng, H., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 7048;
- ⁷⁹ Kirk, K. L., *Org. Proc. Res. Develop.*, **2008**, *12*, 305;
- ⁸⁰ Middleton, W. J., *J. Org. Chem.*, **1975**, *40*, 574;

-
- ⁸¹ Olah, G. A., Nojima, M., Kerekes, I., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 925;
- ⁸² Jeong, L. S., Marquez, V. E., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 4276;
- ⁸³ Kobayashi, T., Maeda, M., Komatsu, H., Kojima, M., *Chem. Pharm. Bull.*, **1982**, 30, 3082;
- ⁸⁴ Kumar, V., Roger, C., Bell, M. R., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 4591;
- ⁸⁵ Kim, K. Y., Kim, B. C., Lee, H. B., Shin, H., *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 8106;
- ⁸⁶ Liotta, C. L., Harris, H. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 2250;
- ⁸⁷ Kawakami, Y., Yamashita, Y., *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 3930;
- ⁸⁸ Bosch, P., Camps, F., Chamorro, E., Gasol, V., Guerrero, A., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 4733;
- ⁸⁹ Hallett, D. J., Gerhard, U., Goodacre, S. C., Hitzel, L., Sparey, T. J., Thomas, S., Rowley, M., *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 4984;
- ⁹⁰ Cox, D. P., Terpinski, J., Lawrynowicz, W., *J. Org. Chem.*, **1984**, 49, 3216;
- ⁹¹ Bosch, P., Camps, F., Chamorro, E., Gasol, V., Guerrero, A., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 4733;
- ⁹² Bérubé, M., Kamal, F., Roy, J., Poirier, D., *Synthesis*, **2006**, 18, 3085;
- ⁹³ Hell, C., *Ber.*, **1881**, 14, 891; Volhard, J., *Ann. Chem.*, **1887**, 242, 141; Zelinsky, N., *Ber.*, **1887**, 20, 2026;
- ⁹⁴ Molines, H., Massoudi, M. H., Cantacuzene, D., Wakselman, C., *Synthesis*, **1983**, 4, 322;
- ⁹⁵ Nyffeler, P. T., Durón, S. G., Burkart, M. D., Vincent, S. P., Wong, C.-H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 192;
- ⁹⁶ Stavber, G., Zupan, M., Jereb, M., Stavber, S., *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4973;
- ⁹⁷ Shibata, N., Suzuki, E., Asahi, T., Shiro, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 7001;
- ⁹⁸ Marma, M. S., Khawli, L. A., Harutunian, V., Kashemirow, B. A., McKenna, C. E., *J. Fluorine Chem.*, **2005**, 126, 1467;
- ⁹⁹ Olah, G. A., Welch, J. T., Vankar, Y. D., Nojima, M., Kerekes, I., Olah, J. A., *J. Org. Chem.*, **1979**, 44, 3872;
- ¹⁰⁰ Dziemidowicz, J., Witt, D., Sliwka-Kaszynska, M., Rachon, J., *Synthesis*, **2005**, 4, 569;
- ¹⁰¹ Metcalf, B. W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M. J., Casara, P., Vevert, J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 2551;
- ¹⁰² Koomoa, D. L. T., Yco, L. P., Borsics, T., Wallick, C. J., Bachmann, A. S., *Cancer Res.*, **2008**, 68, 9825;
- ¹⁰³ Feller, A., Ramos, F., Pierard, A., Dubois, E., *Eur. J. Biochem.*, **1999**, 261, 163;
- ¹⁰⁴ Jaklitsch, W. M., Kubicek, C. P., *Biochem. J.*, **1990**, 269, 247;
- ¹⁰⁵ Quezada, H., Aranda, C., DeLuna, A., Hernandez, H., Calcagno, M. L., Marin-Hernandez, A., Gonzalez, A., *Microbiology*, **2008**, 154, 1656;
- ¹⁰⁶ Bey, P., Vevert, J. P., Van Dorselaer, V., Kolb, M., *J. Org. Chem.*, **1979**, 44, 2732;

-
- ¹⁰⁷ Adger, B. M., Barkley, J. V., Bergeron, S., Cappi, M. W., Flowerdew, B. E., Jackson, M. P., McCague, R., Nugent, T. C., Roberts, S. M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1997**, *1*, 3501;
- ¹⁰⁸ Murray, R. W., Iyanar, K., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 1730;
- ¹⁰⁹ Cooper, M. S., Heaney, H., Newbold, A. J., Sanderson, W. R., *Synlett.*, **1990**, *9*, 533;
- ¹¹⁰ Guthrie, R. W., Hamilton, J. G., Kierstead, R. W., Miller, O. N., Sullivan, A. C., U. S. Patent, **1976**, 3966772;
- ¹¹¹ Bochwic, B., *Preparatyka Organiczna*, PWN – Warszawa, 1975;
- ¹¹² Jin, H., Zhao, H., Zhao, F., Li, S., Liu, W., Zhou, G., Tao, K., Hou, T., *Ultrasonics Sonochemistry*, **2009**, *16*, 304;
- ¹¹³ Sternberg, W., *Chem. Zentr.*, **1902**, *1*, 300;
- ¹¹⁴ Singh, R. P., Shreeve, J. M., *Synthesis*, **2002**, *17*, 2561;
- ¹¹⁵ Chênevert, R., Ngatcha, B. T., Rose, Y. S., Goupil, D., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *9*, 4325-4329;
- ¹¹⁶ Loewenstein, A., Gilboa, H., *Spectrochim. Acta*, **1966**, *22*, 1939;
- ¹¹⁷ Kur, K., Syntaza homocytrynianowa i homoakonitaza z *Candida albicans* - potencjalne cele molekularne dla chemoterapii przeciwgrzybowej, rozprawa doktorska, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, **2010**;
- ¹¹⁸ Kur, K., Milewski, S., Homocitrate synthase as a novel target for antifungal agents, Trends in Enzymology, Saint-Malo, France, July **2008**, 51;
- ¹¹⁹ Gabriel, I., Szwed, P., Kur, K., Prokop, M., Milewska, M. J., Milewski, S., Enzymes of the lysine biosynthetic pathway as targets for antifungals, 35th FEBS Congress – Molecules of Life, Gothenburg, Sweden, June **2010**, *FEBS J*, *277*, suppl. 1, 94;
- ¹²⁰ Jaklitsch, W. M., Kubicek, C. P., *Biochem J.*, **1999**, *269*, 247;
- ¹²¹ Strassman, M., Ceci, L. N., *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 5401;
- ¹²² Lin, Y., Alguindigue, S. S., Volkman, J., Nicholas, K. M., West, A. H., Cook, P. F., *Biochemistry*, **2007**, *46*, 890.