

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Wydział Chemiczny

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Michał Mroczkiewicz

**Badania nad zastosowaniem reakcji Ugiego
do syntezy tripeptydów oraz peptoidów o aktywności biologicznej**

Promotor
Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski

Warszawa, 2009

*Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi,
Panu prof. dr. hab. inż. Ryszardowi Ostaszewskiemu
za wszechstronną pomoc w trakcie realizacji pracy*

*Dziękuję Pani mgr inż. Katarzynie Winkler za pomoc
w wykonaniu badań nad syntezą tripeptydów
oraz Pani Małgorzacie Ćwiklak za pomoc
w wykonaniu badań nad syntezą pochodnych indolowych*

*Panu dr. inż. Wiktorowi Szymańskiemu
dziękuję za lata wspólnej pracy*

*Dziękuję również Koleżankom i Kolegom z zespołu
za współpracę*

*Szczególnie gorąco dziękuję mojej żonie Monice
za wsparcie i motywację do pracy*

*Dziękuję Panu prof. dr. hab. Jakubowi Gołąbowi
z Zakładu Immunologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*

oraz

*Pani dr Izabeli Młynarczuk-Biały
z Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
za przeprowadzenie badań aktywności biologicznej uzyskanych związków*

*Chciałbym również podziękować Panu Dyrektorowi
Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie
za umożliwienie mi wykonania części badań w Instytucie*

*Część badań była finansowana przez
Komitet Badań Naukowych
Grant PBZ-KBN 126/T09/07*

oraz

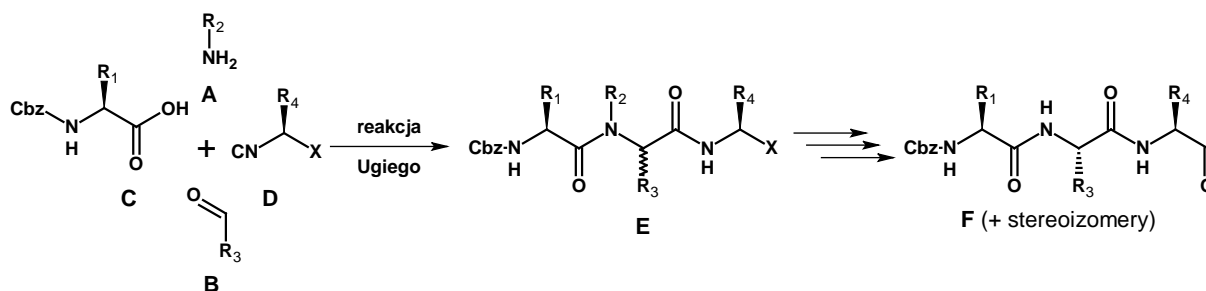
*ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego
i Budżetu Państwa w ramach Zintegrowanego Programu
Operacyjnego Rozwoju Regionalnego, Działania 2.6
„Regionalne Strategie Innowacyjne i transfer wiedzy”
projektu własnego Województwa Mazowieckiego
„Mazowieckie Stypendium Doktoranckie”*



Monice

Streszczenie

W pracy **Badania nad zastosowaniem reakcji Ugiego do syntezy tripeptydów oraz peptoidów o aktywności biologicznej** głównym założeniem badań było opracowanie ogólnej metody syntezy tripeptydów z C-końcową grupą aldehydową posiadających dowolną konfigurację absolutną na każdym centrum stereogenicznym. Do budowy szkieletów peptydowych wykorzystano multikomponentową reakcję Ugiego z zastosowaniem aminy **A**, aldehydu **B** a także chiralnych, nieracemicznych reagentów karboksylowych **C** oraz izocyjankowych **D**. Diastereoizomeryczne produkty reakcji Ugiego **E** poddano dalszym przemianom polegającym na: (a) usunięciu grupy R_2 zabezpieczającej wiązanie amidowe, (b) rozdzieleniu mieszaniny diastereoizomerycznych związków, oraz (c) funkcjonalizacji prekursora grupy aldehydowej X z otrzymaniem produktów docelowych **F**.



Opracowaną ogólną metodę syntezy zastosowano do otrzymania wszystkich ośmiu stereoizomerów znanego inhibitora proteasomów MG-132 (Cbz-Leu-Leu-Leu-al). Badania biologiczne wykazały zasadniczą zależność pomiędzy strukturą a aktywnością uzyskanych związków. Wykazano, że stereoizomer o konfiguracji (*S,R,S*) posiadał najwyższą aktywność biologiczną.

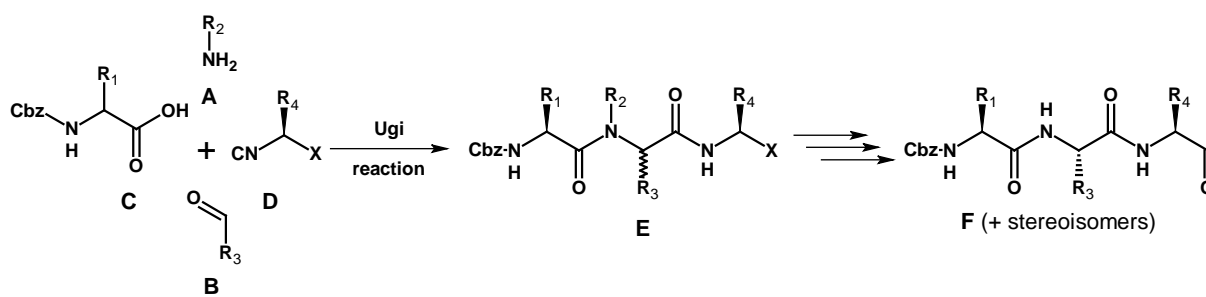
W pracy przedstawiono wyniki badań nad syntezą tripeptydów z α,α -dipodstawionymi aminokwasami oraz z innymi niż aldehydowa grupami C-końcowymi, a także aldehydów dipeptydowych z niepeptydowymi grupami N-końcowymi.

Reakcję Ugiego wykorzystano także do syntezy peptoidów o strukturze *N*-alkilowanych oligoglicyn. Stwierdzono, że odpowiednią formą formaldehydu stosowanego jako reagent karbonylowy w syntezie tego typu związków jest paraformaldehyd. Metodę syntezy peptoidów z zastosowaniem reakcji multikomponentowej wykorzystano do syntezy grupy pentapeptoidów z różnymi podstawnikami na atomach azotu w wiązaniach amidowych.

Wykazano w ten sposób możliwość szerokiego zastosowania reakcji Ugiego do syntezy peptydów oraz różnych analogów tej grupy związków.

Abstract

The main matter of the thesis **Studies on the application of Ugi reaction for the synthesis of biologically active tripeptides and peptoids** was the elaboration of the methodology for the synthesis of tripeptides with C-terminal aldehyde group possessing arbitrary absolute configuration at stereogenic centers. For the construction of peptide skeletons multicomponent Ugi reaction was applied. As a substrates amine **A**, aldehyde **B** and chiral, non-racemic carboxylic acids **C** and isocyanides **D** were used. Diastereoisomeric products of Ugi reaction **E** were subjected to the subsequent reactions: (a) removal of amide bond protecting group R_2 , (b) resolution of diastereoisomeric mixtures, and (c) functionalisation of aldehyde precursor group X leading to the final compounds **F**.



Developed methodology was applied for the synthesis of all stereoisomers of the known proteasome inhibitor MG-132 possessing a structure of tripeptide aldehyde Cbz-Leu-Leu-Leu-al. Biological studies confirmed a high proteasome inhibitory activity of peptides possessing amino acids with non-natural absolute configuration. In this way it was shown that activity of compounds is highly dependent on their spatial structure.

In the thesis were also presented results of the studies on the synthesis of tripeptides with α,α -disubstituted amino acids and other than aldehyde C-terminal functional groups as well as dipeptide aldehydes with non-peptidyl N-terminal groups.

Ugi reaction was also used for the synthesis of peptoids having the *N*-substituted oligocycine structure. It was found that appropriate form of formaldehyde used as formyl substrate of multicomponent reaction is paraformaldehyde. A method of peptoid synthesis with the application of Ugi reaction was used for the preparation of a group of pentapeptoids with a variety of *N*-protection of amide bonds.

Generally in the thesis a wide application of Ugi reaction for the synthesis of peptides and their various analogues was shown.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej zostały opisane w następujących publikacjach:

- Mroczkiewicz, M.; Ostaszewski, R. „A new and general method for the synthesis of tripeptide aldehydes based on the multi-component Ugi reaction”, *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 4025-4034.
- Mroczkiewicz, M.; Winkler, K.; Nowis, D.; Placha, G.; Golab, J.; Ostaszewski, R. „The studies on the synthesis of all stereoisomers of MG-132 proteasome inhibitors in the tumor targeting approach”, *J. Med. Chem.*, (praca wysłana do recenzji)
- Mroczkiewicz, M.; Ostaszewski, R. „Studies on the application of Ugi reaction for a new and rapid method of peptoids synthesis”, *Arkivoc*, (praca wysłana do recenzji)

Ponadto wyniki badań zostały zaprezentowane w formie czterech wystąpień ustnych oraz siedmiu plakatów na konferencjach krajowych i zagranicznych

Opublikowane prace, które nie wchodzą w skład niniejszej pracy doktorskiej:

- Orłowska, M.; Kledzik, K.; Mroczkiewicz, M.; Ostaszewski, R.; Kłonkowski, A. M. „Photoinduced electron transfer and surface plasmon resonance in materials consisting of a pyrene fluorophore and Au nanorods immobilized on MCM-48 surface”, *J. Non-Cryst. Solids*, **2008**, *354*, 4426-4432.
- Orłowska, M.; Kledzik, K.; Mroczkiewicz, M.; Ostaszewski, R.; Kłonkowski, A. M. „Recognition material for Cu(II) ions based on photoinduced electron transfer and surface plasmon resonance effects”, *Polish J. Chem.* **2008**, *82*, 1289-1293.
- Mroczkiewicz, M.; Fryszkowska, A.; Ostaszewski, R. „Zastosowanie esterazy z wątroby świńskiej w syntezie organicznej”, *Biotechnologia* **2005**, *62*, 32-47.
- Fryszkowska, A.; Mroczkiewicz, M.; Ostaszewski, R. „Application of home made pig liver esterase for the synthesis of selected peptidomimetics”, *Ann. Pol. Chem. Soc.* **2004**, *3*, 700-703.

Spis treści

Spis skrótów.....	14
1. Wstęp.....	15
2. Reakcje multikomponentowe.....	16
2.1. Reakcja Ugiego.....	16
2.1.1. Stereoselektywna reakcja Ugiego.....	18
2.1.1.1. Wpływ chiralnych amin na stereoselektywność reakcji Ugiego.....	19
2.1.1.2. Stereoselektywna reakcja Ugiego z zastosowaniem innych niż aminowe chiralnych reagentów.....	20
2.1.2. Zastosowanie reakcji Ugiego do syntezy peptydów z odbezpieczoną grupą amidową.....	22
2.1.2.1. Reakcja Ugiego z amoniakiem.....	22
2.1.2.2. Reakcja Ugiego z aminami R-NH ₂ posiadającymi labilne grupy zabezpieczające wiązanie amidowe.....	24
2.1.3. Synteza α,α' -dipodstawionych aminokwasów w reakcji Ugiego.....	26
2.1.4. α -Izocyjanooctany jako pochodne α -aminokwasów.....	28
2.1.4.1. Zastosowanie α -izocyjanooctanów jako substratów do reakcji Ugiego.....	29
2.1.5. <i>N</i> -Podstawione oligoglicyny jako peptoidy otrzymywane w reakcji Ugiego.....	30
2.1.6. Podsumowanie zastosowania reakcji Ugiego do syntezy peptydów i peptoidów.....	33
3. Proteasom.....	34
3.1. Funkcje proteasomu w organizmie.....	34
3.2. Mechanizm biologicznej aktywności układu ubikwityna-proteasom.....	35
3.3. Budowa proteasomu.....	36
3.3.1. Proteasom 26S.....	36
3.3.1.1. Proteasom 19S.....	36
3.3.1.2. Proteasom 20S.....	37
3.3.1.2.1. Selektowność podjednostek β proteasomu 20S.....	39
3.4. Mechanizm działania proteasomu.....	41
3.5. Inhibicja proteasomu.....	41
3.5.1. Przegląd inhibitorów proteasomów.....	41
3.5.1.1. Aldehydy.....	42
3.5.1.2. Kwasy boronowe.....	47
3.5.1.3. Epoksyketony.....	50
3.5.1.4. Winylosulfony.....	52
3.5.1.5. Inne grupy inhibitorów proteasomów.....	53
3.5.1.6. Podsumowanie przeglądu inhibitorów proteasomów.....	56
4. Synteza tripeptydów.....	59
4.1. Metody klasycznej syntezy tripeptydów.....	59
4.1.1. α -Aminoaldehydy oraz tripeptydy z grupą aldehydową.....	59
4.1.1.1. α -Aminoaldehydy.....	61
4.1.1.2. Tripeptydy z C-końcową grupą aldehydową.....	62
4.2. Enzymatyczna synteza peptydów.....	66
5. Synteza i właściwości peptoidów.....	71
6. Wyniki własne.....	74
6.1. Cel badań.....	74
6.2. Badania nad opracowaniem ogólnej metody syntezy tripeptydów z C-końcową grupą aldehydową.....	76

6.2.1.	Synteza reagentów kwasowych.....	76
6.2.2.	Badania nad syntezą chiralnych izocyjanów.....	77
6.2.3.	Badania nad zastosowaniem amoniaku jako reagenta aminowego w reakcjach Ugięgo.....	79
6.2.4.	Badania nad syntezą szkieletu peptydowego w reakcji Ugięgo.....	80
6.2.5.	Badania nad opracowaniem metody funkcjonalizacji C-końcowych grup funkcyjnych – prekursorów grupy aldehydowej.....	83
6.2.6.	Badania nad opracowaniem optymalnych warunków selektywnego utleniania grupy alkoholowej w pochodnych 2-amidoetanolu.....	84
6.2.7.	Badania nad usunięciem grupy zabezpieczającej wiązanie peptydowe.....	85
6.2.8.	Synteza tripeptydu z C-końcową grupą aldehydową bez zabezpieczenia wiązania amidowego.....	87
6.2.9.	Podsumowanie etapu badań nad modelową syntezą tripeptydów z C-końcową grupą aldehydową.....	88
6.3.	Badania nad syntezą chiralnych substratów reakcji Ugięgo.....	88
6.3.1.	Synteza chiralnych kwasów karboksylowych.....	89
6.3.2.	Badania nad syntezą chiralnych izocyjanów.....	89
6.4.	Badania nad syntezą Cbz-Leu-Leu-Leu-al w reakcji Ugięgo z zastosowaniem chiralnych substratów.....	92
6.4.1.	Badania nad zastosowaniem reakcji Ugięgo do syntezy inhibitora proteasomów MG-132 (<i>S,S,S</i>)- 1 oraz jego epimeru (<i>S,R,S</i>)- 1	93
6.4.2.	Badania nad enzymatycznym rozdziałem mieszanin diastereoizomerycznych produktów reakcji Ugięgo.....	96
6.4.3.	Badania nad rozdziałem mieszanin diastereoizomerycznych reakcji Ugięgo z zastosowaniem metod chromatograficznych oraz synteza wszystkich stereoizomerów aldehydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al.....	98
6.5.	Badania biologicznej aktywności stereo izomerów aldehydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al.....	102
6.6.	Badania biologicznej aktywności związków otrzymanych w poszczególnych etapach syntezy.....	105
6.7.	Synteza aldehydów tripeptydowych posiadających <i>N</i> -zabezpieczone grupy amidowe.....	107
6.8.	Badania nad zastosowaniem ketonów jako reagentów karbonylowych w reakcjach Ugięgo.....	109
6.9.	Badania nad syntezą tripeptydów z C-końcowymi ugrupowaniami soli tiomocznikowych i grupami estrowymi kwasów fosfonowych.....	112
6.9.1.	Badania nad wprowadzeniem ugrupowania soli tiomocznikowej do struktury tripeptydów.....	112
6.9.2.	Badania nad wprowadzeniem do struktury tripeptydów C-końcowej grupy estrowej kwasu fosfonowego.....	114
6.10.	Badania nad syntezą dipeptydów na drodze reakcji Ugięgo z niepeptydowymi kwasami karboksylowymi.....	115
6.10.1.	Badania nad zastosowaniem kwasu 2-pirazynekarboksylowego w reakcji Ugięgo.....	116
6.10.2.	Badania nad zastosowaniem pochodnych indolowych z grupą karboksylową jako reagentów kwasowych w reakcji Ugięgo.....	116
6.11.	Badania nad zastosowaniem reakcji Ugięgo do syntezy peptoidów o strukturze <i>N</i> -alkilowanych oligoglicyn.....	121
7.	Wnioski.....	128

8.	Część eksperymentalna.....	130
8.1.	Uwagi wstępne.....	130
8.2.	Synteza α -aminokwasowych karboksylowych reagentów reakcji Ugiego.....	131
8.3.	Synteza izocyjnaków achiralnych 5a-5d	132
8.4.	Modelowe reakcje Ugiego z izocyjankiem allilowym (5a).....	136
8.5.	Modelowa synteza aldehydu 27 i jego pochodnych z zastosowaniem reakcji Ugiego z izocyjankami 5a-5e	137
8.5.1.	Reakcje Ugiego z izocyjankami 5a-5e	137
8.5.2.	Synteza alkoholu 26	139
8.5.3.	Synteza aldehydu 27	140
8.6.	Optymalizacja modelowego utleniania <i>N</i> -(2-hydroksyetylo)benzamidu (29) do <i>N</i> -(2-oksoetylo)benzamidu (30).....	142
8.7.	Modelowa synteza aldehydu 35 z zastosowaniem reakcji Ugiego z izocyjankami 5c-5e	144
8.7.1.	Reakcje Ugiego z izocyjankami 5c-5e	144
8.7.2.	Reakcje usuwania grupy Dmb i synteza aldehydu 35	146
8.8.	Synteza reagenta Burgessa.....	149
8.9.	Synteza chiralnych izocyjnaków z leucyny.....	150
8.9.1.	Synteza izocyjanku (<i>S</i>)- 41	150
8.9.2.	Synteza izocyjnaków (<i>S</i>)- 45 i (<i>R</i>)- 45	151
8.10.	Synteza mieszaniny epimerów (<i>S,S,S</i>)- 1 i (<i>S,R,S</i>)- 1	155
8.11.	Katalizowana enzymatycznie hydroliza wiązania estrowego w mieszaninie diastereoizomerów (<i>S,S,S</i>)- 49 i (<i>S,R,S</i>)- 49 do alkoholi (<i>S,S,S</i>)- 52 i (<i>S,R,S</i>)- 52	157
8.11.1.	Chemiczna hydroliza mieszaniny diastereoizomerów (<i>S,S,S</i>)- 49 i (<i>S,R,S</i>)- 49	157
8.11.2.	Przegląd enzymów – dobór odpowiedniego enzymu jako katalizatora reakcji hydrolizy.....	158
8.11.3.	Enzymatyczna hydroliza mieszaniny estrów (<i>S,S,S</i>)- 49 i (<i>S,R,S</i>)- 49 z zastosowaniem różnych rozpuszczalników organicznych.....	158
8.12.	Synteza wszystkich stereoizomerów aldehydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al (1).....	158
8.12.1.	Synteza aldehydów (<i>S,S,S</i>)-(+)- 1 i (<i>S,R,S</i>)-(–)- 1 oraz ich enancjomerów.....	158
8.12.2.	Synteza aldehydów (<i>R,I,S</i>)-(+)- 1 i (<i>R,II,S</i>)-(–)- 1 oraz ich enancjomerów.....	163
8.13.	Synteza aldehydów 56 z grupami zabezpieczającymi wiązanie amidowe.....	167
8.14.	Reakcje Ugiego z zastosowaniem ketonów jako reagentów karboksylowych.....	170
8.15.	Synteza tripeptydów z innymi niż aldehydowa grupami C-końcowymi.....	173
8.15.1.	Synteza tripeptydów z ugrupowaniem soli tiomocznikowej.....	173
8.15.2.	Synteza tripeptydów z ugrupowaniem estru kwasu fosfonowego.....	174
8.16.	Synteza dipeptydów z N-końcową grupą 2-pirazynokarbonylową.....	177
8.17.	Synteza reagenta karboksylowego z ugrupowaniem indolowym.....	178
8.18.	Reakcje Ugiego z zastosowaniem kwasu 96 z ugrupowaniem indolowym.....	181
8.18.1.	Synteza aldehydów z ugrupowaniem indolowym.....	182
8.19.	Synteza peptoidów.....	183
8.19.1.	Synteza peptoidów w reakcji Ugiego z zastosowaniem różnych form formaldehydu.....	184
8.19.2.	Synteza kwasów glutaramowych 110a-110h	185
8.19.3.	Synteza peptoidów w reakcji Ugiego z zastosowaniem kwasów glutaramowych.....	188
8.19.4.	Synteza pentapeptoidów 115a-i z zastosowaniem reakcji Ugiego.....	190
9.	Literatura cytowana.....	196

Spis skrótów

- 1-Nal** - 1-naftyloalanina
2-Nal - 2-naftyloalanina
2-Pyz - grupa 2-pirazynowa
4-Morph - grupa 4-morfolina
Aa - aminokwas
Ac - grupa acetylowa, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$
Ala - alanina
Alk - grupa alkilowa
All - grupa allilowa, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-$
Aloc - grupa alliloksykarbonylowa, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OC}(\text{O})-$
Ar - grupa arylowa
Arg - arginina
Bn - grupa benzylowa, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$
Boc - grupa tert-butoksykarbonylowa, $(\text{CH}_3)_3\text{OC}(\text{O})-$
BOP - heksafluorofosforan benzotriazol-1-iloksy-tris-(dimetyloamino)-fosfonowy
Bz - grupa benzoilowa, $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{O})-$
CAN - azotan cerowoamonowy
Cbz - grupa benzyloksykarbonylowa, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$
DCM - dichlorometan, CH_2Cl_2
DDC - dicykloheksylokarbodiimid
d.e. - nadmiar diastereoizomeryczny
DIBAL-H - wodorek diizobutyloglinowy
DIC - *N,N'*-diizopropylkarbodiimid
DIEA - diizopropylodetyloamina
DMAP - 4-dimetyloaminopirydyna
Dmb - grupa 2,4-dimetoksybenzylowa
DMF - dimetyloformamid
Dmp - grupa 2,4-dimetoksyfenylowa
DMSO - dimetylosulfotlenek
d.r. - proporcja diastereoizomerów
EDC - chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
Et - grupa etylowa, CH_3CH_2-
EtOAc - octan etylu
Fmoc - grupa 9-fluorenylometylokarbonylowa
Glu - kwas glutaminowy
Gly - glicyna
His - histydyna
HOBt - 1-hydroksybenzotriazol
HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa
IBX - kwas jodoksybenzoowy
Ile - izoleucyna
i-Pr - grupa izo-propylowa, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$
LAH - wodorek litowoglinowy, LiAlH_4
Leu - leucyna
MBHA - żywica 4-metylobenzhydryloaminowa
Me - grupa metylowa, CH_3
Met - metionina
MW - mikrofałe
n-Bu - grupa *n*-butylowa, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3-$
nLeu - norleucyna
NMM - *N*-metylomorfolina
OMe - grupa metoksykowa, $\text{CH}_3\text{O}-$
PCC - chloromrówczan pirydyny
PDC - dwuchromian pirydyny
Ph - grupa fenylowa, C_6H_5-
Phe - fenyloalanina
Piv - grupa piwaloilowa, $(\text{CH}_3)_3\text{C}(\text{O})-$
PLE - esteraza z wątroby świnińskiej
Pmb - grupa 4-metoksybenzylowa
Pmc - grupa 2,2,5,7,8-pentametylo-6-chromanosulfonowa
Pmp - grupa 4-metoksyfenylowa
PPL - lipaza z trzustki wieprzowej
p-TosH - kwas *para*-toluenosulfonowy
Py - pirydyna
PyBroP - heksafluorofosforan bromo-tris-pirolidynofosfoniowy
s-Bu - grupa *sec*-butylowa
Su - imid kwasu bursztynowego
TBACl - chlorek trietylobenzylamoniowy
TBTU - tetrafluoroboran 2-(1H-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
t-Bu - grupa *tert*-butylowa
TEA - trietyloamina, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$
TEMPO - 2,2,6,6-tetrametylopiperidyno-1-oksyl
TFA - kwas trifluoroctowy, CF_3COOH
THF - tetrahydrofuran
Thr - treonina
TLC - chromatografia cienkowarstwowa
t.t. - temperatura topnienia
t. wrz. - temperatura wrzenia
Tyr - tyrozyna
U-4CR - multikomponentowa reakcja Ugięgo
Ub - ubikwityna
Val - walina
VS - grupa winylosulfonowa

1. Wstęp

W dobie wzmożonej walki z chorobami cywilizacyjnymi prowadzi się liczne badania mające na celu opracowanie nowych struktur leków o aktywności terapeutycznej. Jednym z najszerszej obecnie badanych kierunków w medycynie i chemii medycznej są choroby nowotworowe, na które w Polsce umiera średnio ok. 70 000 osób rocznie. Wiele uwagi poświęca się zwalczaniu nowotworów z wykorzystaniem zjawiska selektywnej inhibicji proteasomów, których aktywność związana jest z procesami regulacyjnymi komórek. Do leczenia chorób nowotworowych coraz częściej jako leki stosowane są chemoterapeutyki o strukturze peptydów. Szczególnie duże znaczenie mają di- oraz tripeptydy posiadające różnego typu C-końowe grupy funkcyjne.

Poszukiwane są również nowe, udoskonalone metody syntezy związków, również peptydowych, których aktywność przeciwnowotworowa została już wcześniej potwierdzona. Obecnie stosowane klasyczne metody syntezy tych związków posiadają liczne ograniczenia wynikające z wąskiego komercyjnego dostępu do peptydowych substratów. Ponadto w metodach tych rzadko poruszano problem syntezy związków posiadających w swej strukturze aminokwasy o nienaturalnej konfiguracji. Z tego też powodu istnieje niewiele doniesień na temat aktywności biologicznej związków posiadających tego typu elementy strukturalne. Problem ten jest niezmiernie ważny albowiem wiadomo, że różne stereoizomery mogą przedstawiać inny profil aktywności biologicznej.

Nowym, nieklasycznym narzędziem stosowanym do syntezy peptydów są reakcje multikomponentowe oparte na chemii izocyjanów. Szczególnym rodzajem tego typu przemian jest reakcja Ugięgo, której produktami są związki o lokalnej strukturze peptydów posiadających dwa wiązania amidowe. Zastosowanie tej reakcji umożliwia ponadto otrzymanie peptydów o dużym zróżnicowaniu strukturalnym, w tym także zbudowanych z nienaturalnych mono- i dipodstawionych α -aminokwasów.

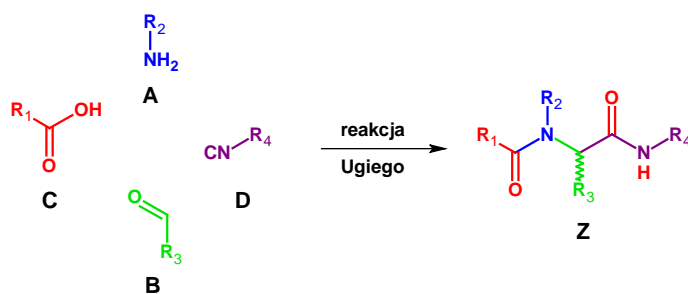
Badania opisane w niniejszej pracy są także próbą odpowiedzi na pytanie, które zawsze nurtuje badaczy: czy znany stereoizomer leku jest rzeczywiście najbardziej aktywny i najmniej toksyczny? Nie można na to pytanie odpowiedzieć jednoznacznie bez wykonania syntez wszystkich stereoizomerycznych jego struktur. Dopiero wtedy można udzielić takiej odpowiedzi, która z punktu widzenia pacjenta ma zasadnicze znaczenie.

2. Reakcje multikomponentowe

Reakcją multikomponentową (MCR) nazywamy taką reakcję, w której więcej niż dwa substraty reagują z utworzeniem produktu, w taki sposób, że w jego skład wchodzi wszystkie lub niemal wszystkie atomy substratów.¹⁻⁶ Produkt jest tworzony zgodnie z kaskadą następujących po sobie reakcji chemicznych (kondensacja, przegrupowanie, eliminacja, itp.). W odróżnieniu od procesów wieloetapowej syntezy reakcje multikomponentowe wymagają małego nakładu pracy oraz czasu, a wydajność oczekiwanych produktów często jest ilościowa. Problemem w prowadzeniu tego typu reakcji jest dobór takich warunków, przy zastosowaniu których nie obserwuje się reakcji ubocznych na żadnym z etapów.

2.1. Reakcja Ugiego

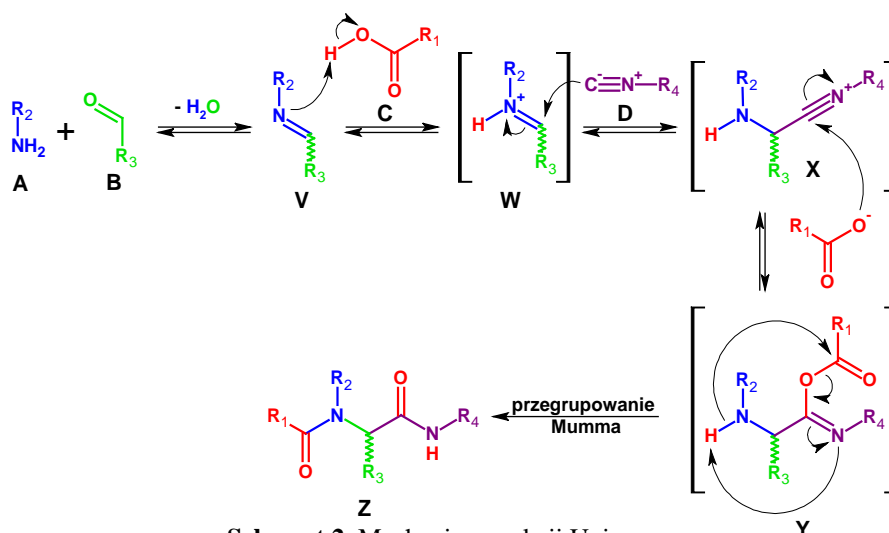
Szeroką, a zarazem intensywnie badaną grupą reakcji multikomponentowych są reakcje, w których jako jeden z reagentów stosowane są izocyjanki.^{1,3,7} Przykładem tego typu reakcji jest czterekomponentowa reakcja Ugiego (U-4CR). Ivar Ugi przeprowadził ją po raz pierwszy w 1958 roku.^{8,9} W reakcji Ugiego substratami są amina **A**, związek karbonylowy (aldehyd lub keton) **B**, kwas karboksylowy **C** oraz izocyjanek **D**. Produktami tej reakcji są związki o strukturze peptydów posiadających dwa ugrupowania amidowe (Schemat 1).



Schemat 1. Schemat reakcji Ugiego.

Reakcję Ugiego charakteryzuje wysoka wydajność atomowa, ponieważ jedynym produktem ubocznym jest cząsteczka wody. Reakcję prowadzi się przeważnie w rozpuszczalnikach alkoholowych takich jak metanol, etanol, trifluoroetanol, rzadziej w rozpuszczalnikach aprotycznych (dimetyloformamid, dichlorometan, chloroform), niekiedy stosuje się również układy wodne lub dwufazowe.^{10,1} Zwykle stosuje się wysokie stężenia reagentów 0,5 – 2,0 M w równomolowych proporcjach.¹

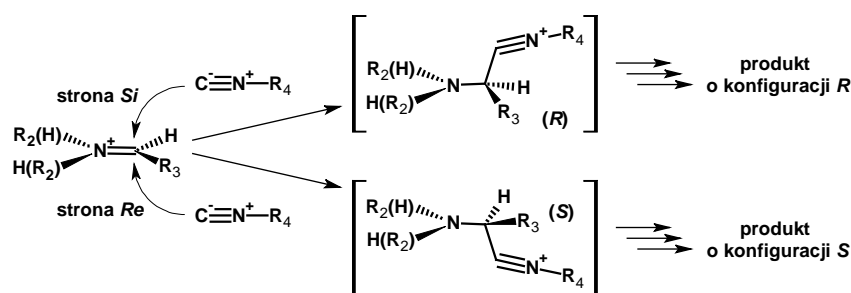
Reakcja Ugiego przebiega zgodnie z następującym mechanizmem. W pierwszym etapie w reakcji kondensacji aminy **A** z aldehydem **B**, z wydzieleniem cząsteczki wody,



Schemat 2. Mechanizm reakcji Ugiego.

powstaje imina **V** (zasada Schiffa). Następnie dochodzi do protonowania atomu azotu (**W**) przez kwas karboksylowy **C**, co powoduje aktywowanie iminy poprzez zwiększenie elektrofilowości wiązania C=N. Aktywację można również osiągnąć poprzez dodatek kwasów Lewisa (TiCl₄, ZnCl₂, BF₃·OEt₂).¹¹⁻¹³ Kolejnym etapem jest nukleofilowy atak izocyjanku **D** na iminiowy węgiel karbonylowy z utworzeniem produktu pośredniego **X**. Nukleofilowy atak anionu kwasu karboksylowego na węgiel pochodzący od izocyjanku prowadzi do powstania α-adduktu **Y**. Ostatnim etapem jest wewnątrzcząsteczkowe przegrupowanie Mumma z przeniesieniem grupy acylowej z atomu tlenu na atom azotu prowadzące do produktu **Z** (Schemat 2). Siłą napędową reakcji jest utlenienie atomu C^{II} izocyjanku do amidowego atomu C^{IV}. Poznanie mechanizmu wskazuje prawidłową kolejność podawania reagentów **A + B + C + D**. Zmiana tej kolejności może być efektem tworzenia licznych produktów ubocznych. Jednym z produktów ubocznych reakcji Ugiego może być produkt trójkomponentowej reakcji Passeriniego, zachodzącą pomiędzy związkiem karbonylowym, kwasem karboksylowym oraz izocyjankiem.¹

Należy zwrócić uwagę, że zgodnie z mechanizmem produkt reakcji Ugiego **Z** powstaje jako równomolowa mieszanina izomerów różniących się konfiguracją na atomie węgla pochodzącym od grupy karbonylowej aldehydu. Na tym węglu powstaje nowe centrum stereogeniczne. W pierwszym etapie reakcji Ugiego powstaje mieszanina stereoizomerów *E* i *Z* iminy. Bez względu na proporcję tych stereoizomerów, gdy w układzie nie znajdują się czynniki stereoróżnicujące atak nukleofilowy izocyjanku na protonowaną iminę możliwy jest zarówno od strony *Si* jak i *Re* dając w rezultacie dwa produkty, odpowiednio o konfiguracji *R* i *S* (Schemat 3). Jakkolwiek w innych reakcjach multikomponentowych np. w reakcji Passeriniego,¹⁴ przy zastosowaniu achiralnych substratów istnieje możliwość uzyskania



Schemat 3. Schemat tworzenia w reakcji Ugiego mieszaniny produktów o różnej konfiguracji absolutnej.

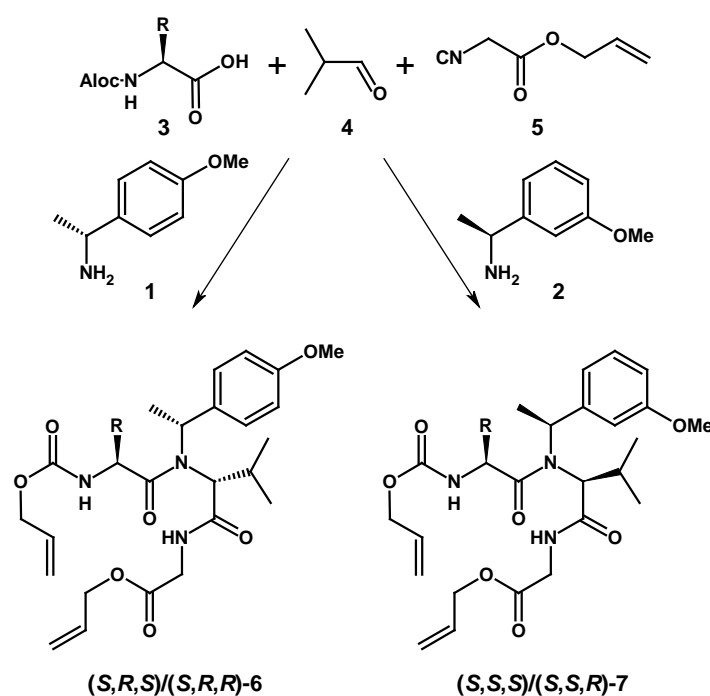
enantjoselektywności poprzez dodatek kwasów Lewisa, tak w reakcji Ugiego takiego efektu nie obserwuje się.¹⁵ W przypadku stosowania w reakcji Ugiego chiralnych, enancjomerycznie czystych substratów, które nie racemizują w warunkach reakcji, produkty otrzymuje się jako mieszaninę dwóch diastereoizomerów. Niekiedy substraty tego typu mają właściwości stereoróżnicujące, a wówczas poprzez stereokontrolę reakcji otrzymuje się nierównomolowe mieszaniny produktów. Kwasy Lewisa mogą nieznacznie intensyfikować wpływ chiralnych substratów na diastereoselektywność reakcji Ugiego.¹⁵ Kwasy te wpływają również na kinetykę reakcji Ugiego przyspieszając ją.¹⁵ Problemem staje się jednak rozdział mieszanin produktów. W momencie, w którym opracuje się metodę rozdzielania mieszanin produktów reakcji multikomponentowych fakt tworzenia się dwóch izomerów, można wykorzystać do otrzymywania związków, także peptydów, o nienaturalnej konfiguracji na centrach stereogenicznych.

2.1.1. Stereoselektywna reakcja Ugiego

Istnieje wiele doniesień na temat wpływu chiralnych reagentów na stereoselektywny przebieg reakcji Ugiego.^{16,3} Bardzo dużo przykładów syntezy z wykorzystaniem chiralnych reagentów opiera się na wykorzystaniu różnego typu pochodnych α -aminokwasów. Każdy rodzaj stosowanych substratów może być użyty w postaci chiralnej, jednakże stosowanie nie każdego z nich osobno prowadzi do uzyskania jednego z diastereoizomerycznych produktów w nadmiarze. Przykładowo stosowanie chiralnych izocyjanów nie powoduje żadnej diastereoselektywności w reakcji Ugiego.^{17,18} Podobnie ma się sytuacja w większości przypadków stosowania chiralnych aldehydów¹⁹ oraz kwasów,^{20,21} a produkty powstają wówczas jako mieszanina dwóch diastereoizomerów w proporcji 1:1. Istnieje natomiast możliwość uzyskania stereokontroli reakcji poprzez stosowanie co najmniej dwóch chiralnych komponentów.

2.1.1.1. Wpływ chiralnych amin na stereoselektywność reakcji Ugiiego

Największy wpływ na stereoselektywność reakcji Ugiiego mają chiralne aminy, a nadmiary diastereoizomeryczne uzyskane przy ich zastosowaniu często są bardzo wysokie. Przykładem chiralnych amin stosowanych w diastereoselektywnym wariacie reakcji Ugiiego są (*R*)-*p*-metoksy-1-feniloetyloamina (**1**) oraz (*S*)-*m*-metoksy-1-feniloetyloamina (**2**). Aminy te stosowane były w reakcji Ugiiego z *N*-zabezpieczonymi grupą alliloksykarbonylową (Aloc) chiralnymi α -aminokwasami **3**, aldehydem izobutylowym (**4**) oraz izocyjanooctanem allilu (**5**). W rezultacie otrzymano diastereoizomeryczne mieszaniny tripeptydów **6** i **7** funkcjonalizowane na N- oraz C-końcach (Schemat 4). W reakcji Ugiiego z zastosowaniem

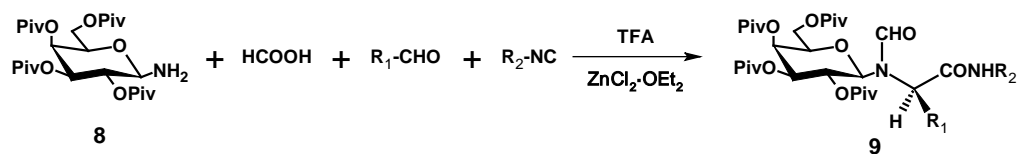


Schemat 4. Diastereoselektywna reakcja Ugiiego z chiralnymi aminami **1** i **2**. Na schemacie przedstawiono produkty **6** i **7** o konfiguracji, której powstawanie jest preferowane w reakcji diastereoselektywnej.

aminy **1** i pochodnej (*S*)-L-waliny **3** (Aloc-Val-OH, R = *i*-Pr) jako komponentu kwasowego otrzymano mieszaninę diastereoizomerów $(S,R,S)/(S,R,R)$ -**6** w proporcjach zależnych od temperatury prowadzenia reakcji. W temperaturze pokojowej otrzymano mieszaninę diastereoizomerów w proporcji 25:75, podczas gdy obniżenie temperatury do -30 °C powodowało znaczny wzrost diastereoselektywności, a produkty otrzymano w proporcji 10:90, z sumaryczną wydajnością 71%. Uzyskane diastereoizomery z powodzeniem rozdzielno metodą chromatografii kolumnowej.²² Metodę tą badano szerzej z zastosowaniem aminy **2** z różnymi pochodnymi α -aminokwasów **3** stosowanych jako komponent kwasowy. Najlepsze efekty, wysoką wydajność oraz wysoki nadmiar diastereoizomeryczny, otrzymano

przy zastosowaniu pochodnej alaniny (Aloc-Ala-OH, R = CH₃). Również w tym przypadku obserwowano wzrost diastereoselektywności przy obniżeniu temperatury. W temperaturze pokojowej otrzymano mieszaninę (*S,S,S*)/(*S,S,R*)-**7** z wydajnością 96% i w proporcji 75:25. Obniżenie temperatury reakcji do -30 °C powodowało nieznaczny spadek wydajności do 91% przy jednoczesnym wzroście proporcji diastereoizomerów do 95:5.^{23,22} Należy zwrócić uwagę, że zmiana konfiguracji absolutnej aminy powoduje zmianę diastereoselektywności reakcji Ugiego. Można zatem poprzez odpowiedni dobór aminy dowolnie kontrolować diastereoselektywność tej reakcji. Dobór jest jednak ograniczony wąskim komercyjnym dostępem chiralnych, enancjomerycznie czystych amin. Peptydowe produkty reakcji Ugiego **6** i **7** w kolejnym etapie były badane pod kątem możliwości cyklizacji na drodze reakcji metatezy.

Bardzo dobrą kontrolę stereochemiczną reakcji Ugiego osiągnięto przy zastosowaniu funkcjonalizowanej galaktozyloaminy **8** jako pomocnika chiralnego (Schemat 5).²⁴ Jednocześnie nie obserwowano istotnego wpływu struktury stosowanych aldehydów i izocyjanów na wyniki reakcji. W reakcji stosowano jeden ekwiwalent eteratu chlorku cynku jako kwasu Lewisa, który wymusza odpowiednią konformację stanu przejściowego iminy poprzez chelatowanie atomu azotu w aminie oraz atomu tlenu grupy karbonylowej. Produkty kondensacji **9** otrzymano z wysokimi wydajnościami (75-93%) oraz bardzo wysokimi proporcjami diastereoizomerów sięgającymi wartości 97:3, z przewagą produktu o konfiguracji (*R*) na nowym centrum stereogenicznym (atom węgla α). Reakcje prowadzono w niskiej temperaturze (-78, -25 lub 0 °C). Z otrzymanych produktów reakcji Ugiego **9** po dalszej funkcjonalizacji (usunięcie grup zabezpieczających atom azotu i grupę karboksylową) otrzymano α-aminokwasy o nienaturalnej D-konfiguracji posiadające nienaturalne alifatyczne i aromatyczne łańcuchy boczne (Schemat 5, R₁ = Alk, Ar).

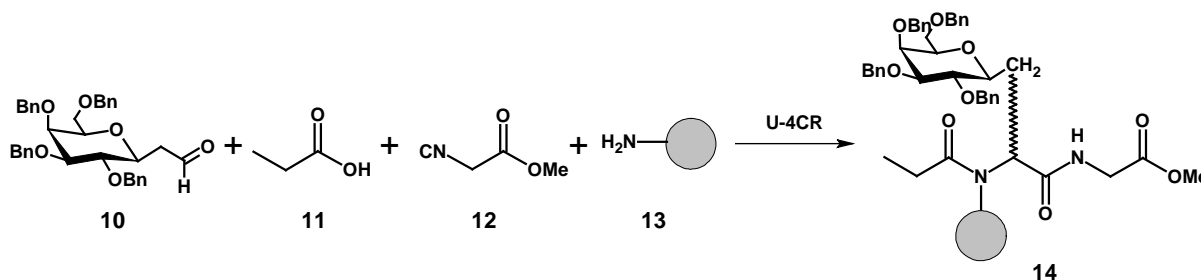


Schemat 5. Diastereoselektywna reakcja Ugiego z pochodną galaktozyloaminy jako pomocnikiem chiralnym (Piv = grupa piwaloilowa = COC(CH₃)₃).

2.1.1.2. Stereoselektywna reakcja Ugiego z zastosowaniem innych niż aminowe chiralnych reagentów

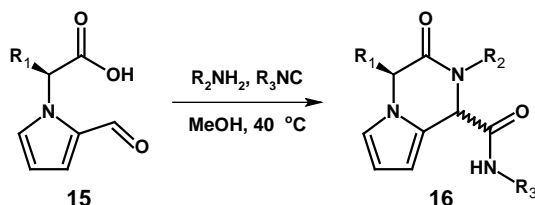
Rzadko osiąga się znaczną diastereoselektywność w reakcjach Ugiego z chiralnymi substratami, wśród których nie występuje reagent aminowy. Przykładem tego typu syntezy

jest reakcja z zastosowaniem chiralnego aldehydu w postaci funkcjonalizowanego węglowodanu – fukozy **10**. Stosowano tu także chiralne (również pochodne fukozy) i achiralne (propionowy) kwasy karboksylowe, izocyjanooctan metylu (**12**) oraz aminę w postaci żywicy Wang’a (**13**) (synteza na stałym nośniku). Produkty **14** otrzymano jako mieszaninę dwóch diastereoizomerów, a największa proporcja izomerów wynosząca 80:20 została osiągnięta przy zastosowaniu kwasu propionowego (**11**) (Schemat 6).²⁵



Schemat 6. Diastereoselektywna reakcja Ugiego z chiralnym aldehydem.

Istnieje także możliwość zastosowania chiralnych reagentów dwufunkcyjnych, w których występują dwie grupy reagujące w reakcji Ugiego. Za przykład można tu podać pochodne aminokwasowe **15** posiadające w swej strukturze grupę karboksylową oraz formylową (Schemat 7).²⁶ W reakcji z benzyloaminą ($R_2 = \text{Bn}$) lub 4-metoksyaniliną ($R_2 = 4\text{-MeOC}_6\text{H}_4$), izocyjankiem *tert*-butylowym ($R_3 = t\text{-Bu}$) oraz dwufunkcyjnym związkiem **15** jako pochodną waliny ($R_1 = i\text{-Pr}$), leucyny ($R_1 = i\text{-Bu}$), izoleucyny ($R_1 = s\text{-Bu}$) lub fenyloalaniny ($R_1 = \text{Bn}$) otrzymano cykliczne ketopiperazyny **16**. Proporcje otrzymanych diastereoizomerów były jednak niskie i zawierały się w zakresie 66:34 do 76:24 (*R,S/S,S*). Przy zastosowaniu chiralnych amin w postaci pochodnych (*S*)- i (*R*)-1-fenyletyloaminy podniesiono nieznacznie diastereoselektywność reakcji, ale proporcja uzyskiwanych produktów nie była wyższa niż 80:20.



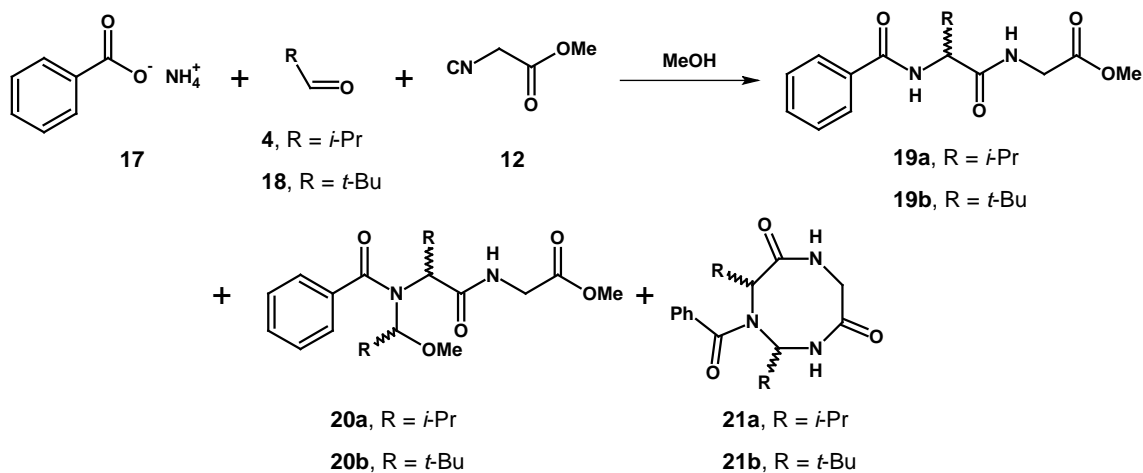
Schemat 7. Diastereoselektywna reakcja Ugiego z chiralnym związkiem dwufunkcyjnym **15**.

2.1.2. Zastosowanie reakcji Ugiego do syntezy peptydów z odbezpieczoną grupą amidową

W produktach reakcji Ugiego jedno z wiązań amidowych jest podstawione grupą R_2 pochodzącą od aminy **B** (Schemat 1). Jest to jeden ze sposobów otrzymywania *N*-alkilowanych peptydów. Istotną zaletą w porównaniu do innych metod syntezy tego typu związków jest jednoetapowe tworzenie szkieletu peptydowego i podstawienie grupy amidowej. Niekiedy jednak grupa R_2 jest niepożądana w cząsteczce produktu, szczególnie ma to miejsce w syntezie peptydów, a problem ten rozwiązywany jest na dwa sposoby. Poprzez taki dobór aminy, której reszta jest możliwa do usunięcia z wiązania peptydowego na drodze prostej przemiany chemicznej lub zastosowanie do reakcji Ugiego amoniaku, w postaci roztworu lub soli amonowej.

2.1.2.1. Reakcja Ugiego z amoniakiem

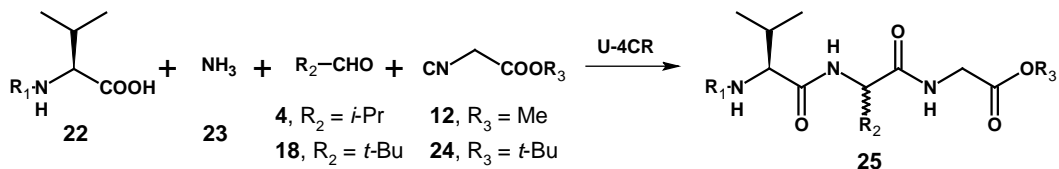
Podjęciem do syntezy dipeptydów w reakcji Ugiego bez konieczności przeprowadzenia następczej reakcji odbezpieczania wiązania amidowego jest stosowanie amoniaku jako reagenta aminowego.^{27,28} Amoniak może być stosowany w postaci mianowanego roztworu w rozpuszczalniku użytym do reakcji lub jako sól amonowa kwasu karboksylowego stosowanego w reakcji Ugiego jako reagent karboksylowy. Stosowanie amoniaku wiąże się jednak z niedogodnościami związanymi z powstawaniem licznych produktów ubocznych reakcji sześciokomponentowych. Na drodze optymalizacji wpływu struktury substratów, ich proporcji oraz rodzaju rozpuszczalnika na przebieg reakcji konkurencyjnych opracowano warunki, w których reakcja Ugiego była faworyzowana. W reakcji modelowej substratami były benzoesan amonu (**17**), aldehyd izobutyloowy (**4**) oraz izocyjanooctan metylu (**12**) (Schemat 8).²⁸ Przy proporcji reagentów 1:1:1 spodziewany produkt **19a** otrzymano w śladowych ilościach (5%), a głównym produktem okazał się związek **20a** powstały w wyniku reakcji sześciokomponentowej między kwasem karboksylowym, aminą (amoniakiem), izocyjankiem, dwoma cząsteczkami aldehydu oraz cząsteczką metanolu stosowanego jako rozpuszczalnik. Produkt **20a** wydzielono z wydajnością 33%. W celu otrzymania związku **20a** z wyższą wydajnością zastosowano nadmiar aldehydu, a reagenty **17**, **4** i **12** użyto w proporcji 1,2:2:1. Zaskakująco, głównym produktem reakcji był związek cykliczny **21a**, powstały zgodnie z innym mechanizmem pomiędzy dwoma cząsteczkami amoniaku, dwoma cząsteczkami aldehydu oraz jedną cząsteczką kwasu i izocykanku. Produkt **21a** wydzielono z wydajnością 62%, a związek **19a**



Schemat 8. Reakcja Ugiego z zastosowaniem soli amoniowej.

obserwowano w śladowych ilościach. Ponieważ metanol stosowany jako rozpuszczalnik był zbyt nukleofilowy i reagował z elektrofilową iminą powstałą w reakcji kondensacji amoniaku i aldehydu izobutyloвого, zastąpiono go mniej nukleofilowym trifluoroetanolom (ponownie w układzie substratów 1:1:1). W efekcie zahamowano powstawanie związku **20a** a produkt **19a** wydzielono z wydajnością 45%. Zahamowanie powstawania obydwu produktów ubocznych **20b** i **21b** osiągnięto poprzez zastosowanie przestrzennie rozbudowanego aldehydu piwaloilowego (**18**). Produkt **19b** otrzymano z dobrą wydajnością 50%, nawet przy zastosowaniu metanolu jako rozpuszczalnika (Schemat 8).²⁸

Opracowaną metodę zastosowano do syntezy tripeptydów. Kwas benzoesowy zastąpiono różnymi *N*-zabezpieczonymi pochodnymi waliny **22** ($R_1 = \text{Cbz, Boc, Cbz-(S)-Pro, Bz}$) (Schemat 9). Jako komponent karbonylowy stosowano aldehyd piwaloilowy ($R_2 = t\text{-Bu}$) (**18**) oraz izobutyloвого ($R_2 = i\text{-Pr}$) (**4**), natomiast jako komponent izocyjanowy izocyjanooctan metylu ($R_3 = \text{Me}$) (**12**) oraz *t*-butylu ($R_3 = t\text{-Bu}$) (**24**). Amoniak stosowany był jako 1,5 M roztwór w metanolu. Zastosowanie sterycznie rozbudowanych kwasów w postaci pochodnych waliny oraz prolilowaliny prowadziło do otrzymania produktów **25** z wydajnością 64 – 79%.²⁷



Schemat 9. Synteza tripeptydów w reakcji Ugiego z amoniakiem jako komponentem aminowym.

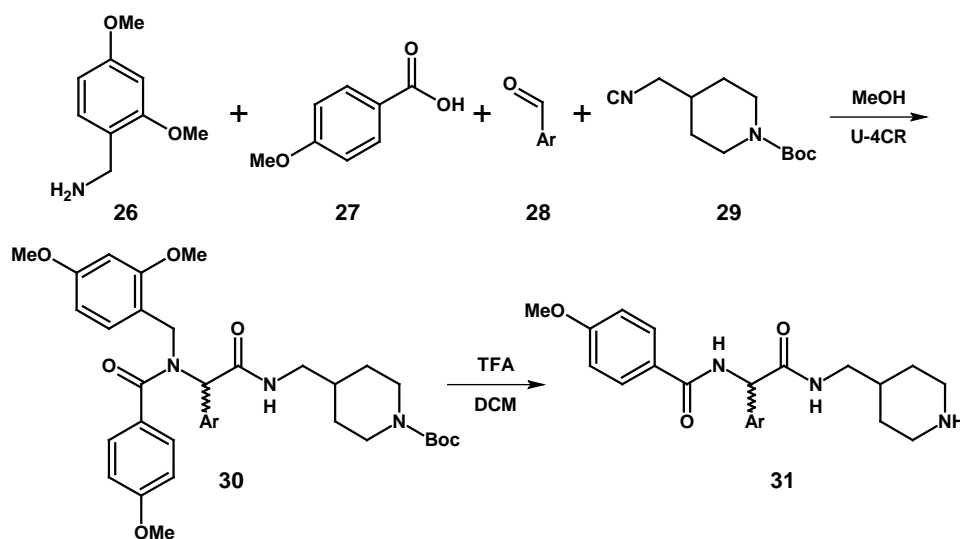
Największą trudnością spotykaną w reakcji Ugiego z amoniakiem jako reagentem aminowym jest przede wszystkim występowanie reakcji ubocznych. Problem ten jest na tyle poważny, że metody tej nie można skutecznie stosować w większości przypadków. Dlatego

też najczęściej stosowaną metodą syntezy niepodstawionych peptydów jest odbezpieczanie wiązania amidowego otrzymanego w reakcji Ugiego z pierwszorzędową aminą.

2.1.2.2. Reakcja Ugiego z aminami R-NH₂ posiadającymi labilne grupy zabezpieczające wiązanie amidowe

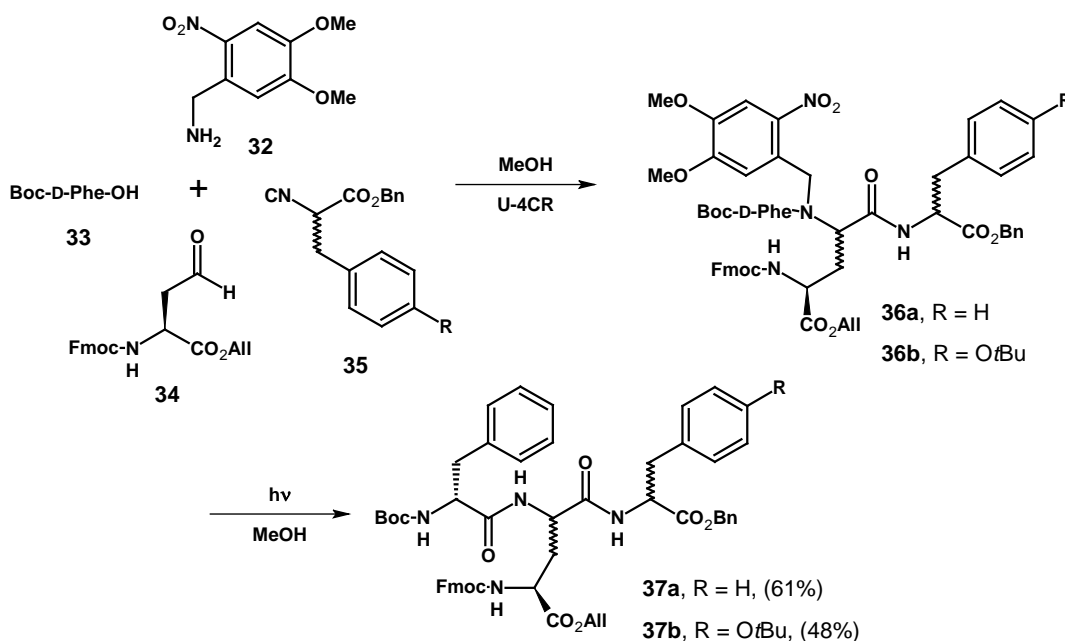
W reakcjach Ugiego stosuje się dwa główne rodzaje amin R-NH₂, których grupy R wbudowując się w strukturę produktu stanowią labilne zabezpieczenia wiązania amidowego. Aminy te są pochodnymi benzyloaminy. Do pierwszego rodzaju należą 4-metoksybenzyloamina (Pmb-NH₂) oraz 2,4-dimetoksybenzyloamina (Dmb-NH₂). Usunięcie grup Pmb²⁹ i Dmb³⁰ możliwe jest na drodze katalizy kwaśnej (kwas trifluorooctowy – TFA) przy czym grupa Dmb jest bardziej kwasolabilna i podatna na usunięcie. Do drugiego rodzaju należą podstawione 2-nitrobenzyloaminy z najczęściej stosowaną 3,4-dimetoksy-2-nitrobenzyloaminą. Podstawiona grupa benzylova usuwana jest w tym wypadku poprzez naświetlanie uzyskanego produktu światłem (reakcja fotolizy).

2,4-Dimetoksybenzyloamina stosowana była w syntezie inhibitorów czynnika Xa (proteazy serynowej), który uczestniczy w procesach koagulacji krwi. Kontrola funkcji czynnika Xa, między innymi poprzez stosowanie inhibitorów, jest istotna przy zapobieganiu powstawania szkodliwych dla zdrowia i życia zakrzepów. W reakcji Dmb-NH₂ (**26**), kwasu 4-metoksybenzoowego (**27**), aromatycznych aldehydów **28** oraz *N*-benzyloksykarbonylo-4-izocyjanometylopiperydyny (**29**) otrzymano produkty **30** (wydajność 15-78%), z których grupa zabezpieczająca Dmb wraz z grupą benzyloksykarbonylową (Boc) usuwana była w reakcji z TFA w dichlorometanie. Nie ma jednak doniesień na temat wydajności tego etapu syntezy (Schemat 10).³⁰



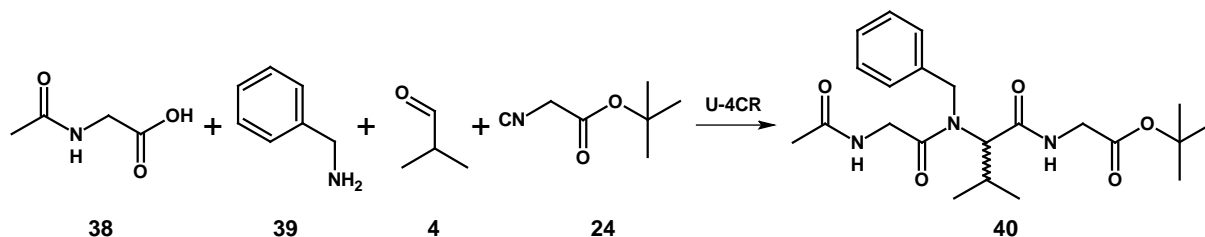
Schemat 10. Reakcja Ugiego z Dmb-NH₂ (**26**) oraz usunięcie grupy Dmb z grupy amidowej w reakcji z TFA.

Zabezpieczenie amidu w postaci grupy 4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylowej stosowano między innymi w syntezie tripeptydów **37**. W reakcji 4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylaminy (**32**) oraz trzech pochodnych aminokwasowych: kwasu **33**, aldehydu **34** oraz izocyjanów **35** otrzymano zabezpieczone tripeptydy **36a** i **36b** jako mieszaniny diastereoizomerów. Produkty tych reakcji bezpośrednio, bez oczyszczania poddano fotolizie, czego rezultatem było usunięcie grupy 4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylowej i otrzymanie tripeptydów **37a** i **37b**, odpowiednio z wydajnościami 61% i 48% dla dwóch etapów (Schemat 11).³¹



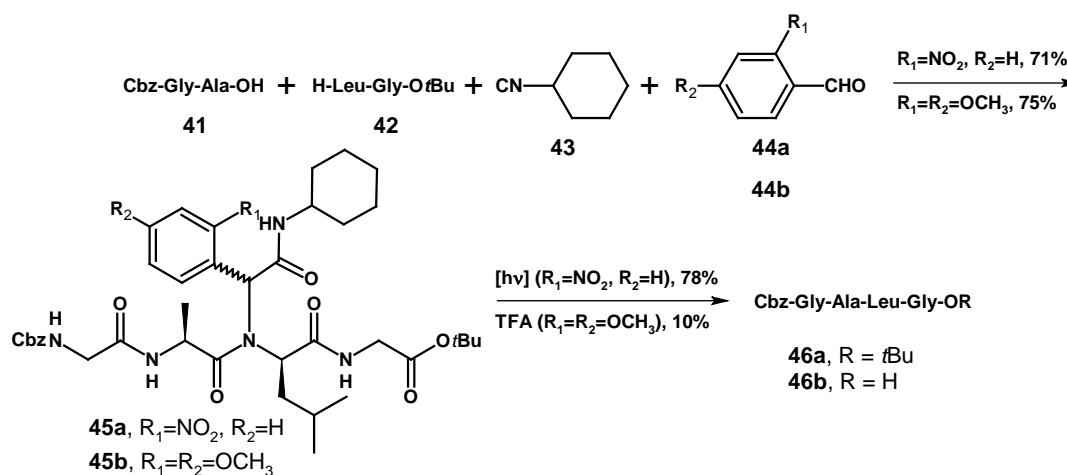
Schemat 11. Reakcja Ugiiego z aminą **32** oraz usuwanie grupy 4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylowej w reakcji fotolizy.

Waki i Meienhofer otrzymali di- tri- oraz tetrapeptydy w reakcji Ugiiego z zastosowaniem pochodnych aminokwasowych lub dipeptydowych. W pierwszym podejściu jako związek modelowy w różnych rozpuszczalnikach otrzymano tripeptyd **40** w reakcji *N*-acetyloglicyny (**38**), benzyloaminy (**39**), aldehydu izobutyloвого (**4**) oraz izocyjanooctanu *tert*-butylu (**24**). Produkt **40** otrzymano jako mieszaninę enancjomerów Ac-Gly-*N*-Bz-DL-Val-Gly-*Ot*Bu (Schemat 12). Najwyższe wydajności otrzymano przy zastosowaniu jako rozpuszczalnika metanolu (72%), 1-butanolu (72%) i trifluoroetanolu



Schemat 12. Synteza tripeptydów w reakcji Ugiiego.

(68%), oraz nieco niższe w chlorku metylenu i chloroformie (po 51%). W tej samej pracy opracowano metodę usuwania z produktów reakcji Ugiego atomów pochodzących z aldehydu oraz izocyjanku. Metodę tą wykorzystano do syntezy di- oraz tetrapeptydów, w skład których wchodziły atomy pochodzące z komponentu kwasowego **41** (Cbz-Gly-Ala-OH) oraz aminowego **42** (H-Leu-Gly-O*t*Bu). Do reakcji Ugiego stosowano izocyjanek cykloheksylowy (**43**) natomiast jako aldehyd pochodne 2-nitro- oraz 2,4-dimetoksy- aldehydu benzoowego (**44a** i **44b**). Usunięcie grupy *N*-(α -cykloheksylokarbamoilo-2-nitrobenzylowej) ($R_1=NO_2$, $R_2=H$) z produktu **45a** osiągnięto na drodze fotolizy przy naświetleniu światłem o długości 350 nm. Produkt **46a** otrzymano z wysoką wydajnością 78%. Z kolei grupę *N*-(α -cykloheksylokarbamoilo-2,4-dimetoksybenzylowej) ($R_1=R_2=OCH_3$) usunięto ze związku **45b** w reakcji z kwasem trifluorooctowym, otrzymując tetrapeptyd **46b** z niską wydajnością 10% (Schemat 13).³²

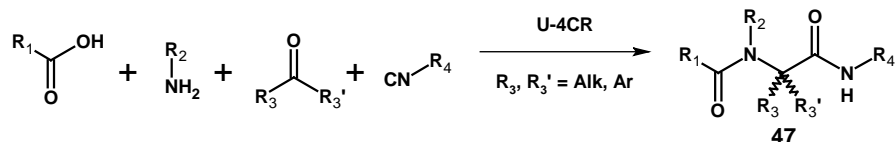


Schemat 13. Synteza tetrapeptydów na drodze reakcji Ugiego i usunięcia zabezpiecznia grupy amidowej.

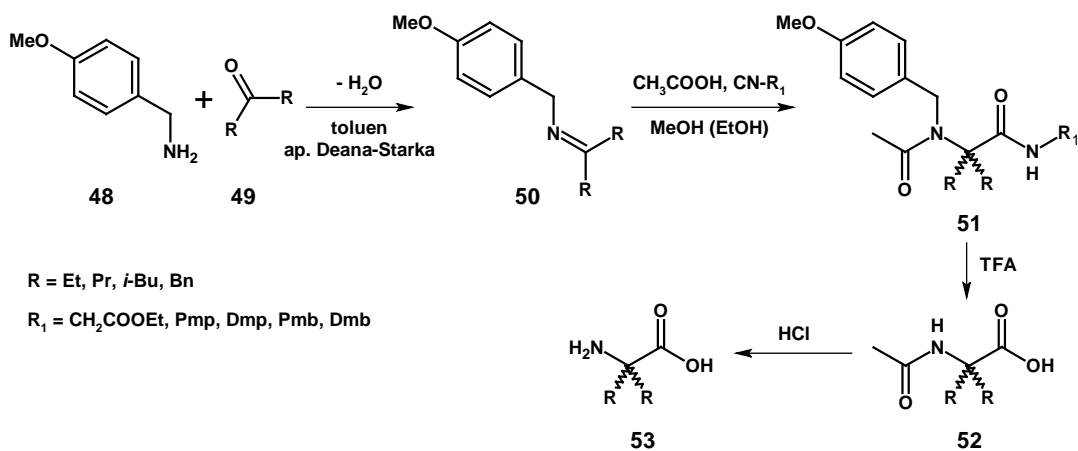
2.1.3. Synteza α,α' -dipodstawionych aminokwasów w reakcji Ugiego

Ogólnie, dużym wyzwaniem jest synteza α,α' -dipodstawionych aminokwasów oraz wprowadzenie ich do struktury peptydów. Zagadnienie to jest możliwe do zrealizowania, aczkolwiek w ograniczonej dowolności, na drodze reakcji Ugiego z zastosowaniem ketonów.

Charakter struktury produktu reakcji Ugiego, w którym występują dwa wiązania amidowe, sprzyja wykorzystaniu tej reakcji do syntezy funkcjonalizowanych di- tri- oraz tetrapeptydów (Schematy 4, 8-13). Poprzez odpowiedni dobór reagenta karbonylowego w postaci aldehydu lub ketonu można dowolnie budować łańcuchy boczne aminokwasów, zarówno naturalnych (kodowanych) jak i nienaturalnych (niekodowanych), a także α,α' -dipodstawionych glicyn. Ponadto na drodze wcześniej przedstawionych metod



Schemat 14. Synteza nowego ugrupowania α,α' -dipodstawionego aminokwasowego w reakcji Ugiego. stereokontrolowanej reakcji Ugiego można tworzyć aminokwasy o przeciwnej do naturalnej konfiguracji absolutnej na węglu α . W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na istotną rolę w reakcji Ugiego reagenta karbonylowego w postaci ketonu, którego reszty ($R_3, R_3' = \text{Alk}, \text{Ar}$) wchodzi w skład łańcuchów bocznych wbudowanego w cząsteczkę produktu **47** α,α' -dipodstawionego aminokwasu (Schemat 14). Nowe ugrupowanie aminokwasowe powstaje między dwoma wiązaniami amidowymi generowanymi w reakcji Ugiego. Jakkolwiek stosowanie aldehydów ($R_3 = \text{Alk}, \text{Ar}; R_3' = \text{H}$) nie wiąże się z większymi utrudnieniami, a produkty otrzymuje się z wysokimi wydajnościami, tak stosowanie ketonów w większości przypadków ogranicza się do stosowania głównie związków z dwoma takimi samymi grupami aliklowymi takich jak aceton³³ lub cykloheksanon³⁴ oraz innych.¹¹ Ketony z dwoma różnymi grupami w reakcji Ugiego stosuje się rzadko i są to na ogół ketony z jedną grupą metylową ($R_3 = \text{Me}$).^{35,36} Problemy związane ze stosowaniem ketonów, w szczególności acyklicznych, wynikają z utrudnionej kondensacji z aminami. Związane to jest z odwracalnością tego procesu, dlatego też jedną ze skuteczniejszych metod rozwiązania tego problemu jest przesunięcie równowagi reakcji w kierunku tworzenia iminy poprzez azeotropowe oddestylowanie wody powstałej w tym procesie. Za przykład może tu posłużyć synteza oraz wstępne wydzielenie imin **50** otrzymanych z 4-metoksybenzyloaminy (**48**) oraz ketonów **49**. Iminy te w kolejnym etapie stosowane były do reakcji Ugiego z izocyjankami oraz kwasem octowym. Otrzymane w ten sposób funkcjonalizowane α,α' -dipodstawione aminokwasy **51** w reakcjach odbezpieczania grupy aminowej oraz karboksylowej



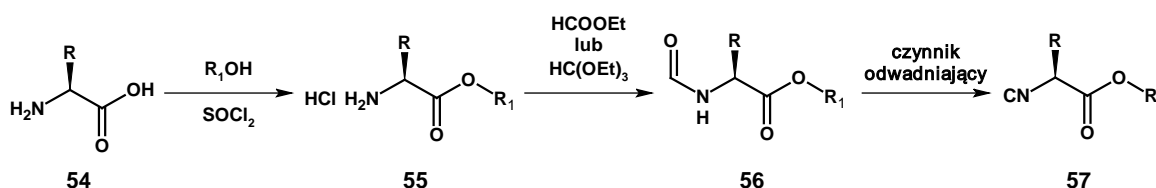
Schemat 15. Synteza acyklicznych α,α' -dipodstawionych glicyn w reakcji Ugiego ze wstępnie wydzielonych imin **50**; Pmp = 4-MeO-C₆H₄, Dmp = 2,4-MeO-C₆H₃, Pmb = 4-MeO-Bn, Dmb = 2,4-MeO-Bn.

przeprowadzone były w produkty **53** (Schemat 15).²⁹ Metody te można skutecznie stosować do syntezy nienaturalnych mono- i di- podstawionych α -aminokwasów.^{24,29}

Istotnym problemem w syntezie aminokwasów i peptydów w reakcji Ugiego jest jednak rozdział powstałych w reakcji enancjomerów lub diastereoizomerów produktu. W przypadku diastereoizomerycznych związków peptydowych często możliwy jest rozdział z wykorzystaniem metod chromatograficznych ponieważ poszczególne diastereoizomery na tyle różnią się polarnością, że możliwy jest ich rozdział. W przypadku syntezy związków z jednym centrum stereogenicznym nie ma takiej możliwości dlatego też należy poszukiwać innych metod rozdziału.

2.1.4. α -Izocyjanooctany jako pochodne α -aminokwasów

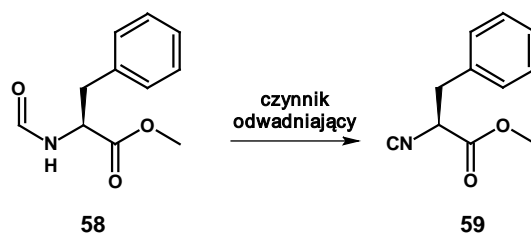
W syntezie peptydów w reakcji Ugiego reagenty izocyjankowe często stosowane są jako pochodne α -aminokwasowe. Izocyjanki te mają na ogół strukturę α -podstawionych lub niepodstawionych izocyjanooctanów otrzymywanych z odpowiednich α -aminokwasów. Istnieje wiele metod syntezy izocyjanków o strukturze **57** z aminokwasów, a ogólny schemat przedstawiony jest poniżej (Schemat 16). Pierwszym etapem jest zabezpieczenie grupy



Schemat 16. Ogólny schemat syntezy α -podstawionych izocyjanooctanów z α -aminokwasów.

karboksylowej aminokwasu **54**, na ogół poprzez estryfikację. W ten sposób otrzymywany jest aminoester w postaci chlorowodoru **55**, którego grupa aminowa w dalszych etapach przekształcana jest w grupę izocyjankową. Najczęściej izocyjanki otrzymywane są z amin w dwuetapowym procesie formylowania atomu azotu oraz odwadniania (dehydratacji) tak powstałej grupy formamidowej. Metody te będą w niniejszej pracy szerzej zaprezentowane. Jako czynniki formylujące najczęściej stosuje się mrówczan etylu lub ortomrówczan etylu. Proces odwadniania prowadzony jest z zastosowaniem szerokiej gamy środków odwadniających. Po raz pierwszy proces odwadniania grupy formamidowej zaprezentował Ugi w 1958 roku, a środkiem odwadniającym był wówczas chlorek oksalilu (COCl_2) z różnymi zasadami w postaci trzeciorzędowych amin.⁸ Kolejnymi środkami odwadniania są: (a) tlenochlorek fosforu (POCl_3) z trietyloaminą (TEA) oraz innymi aminami używanymi jako zasada (najczęściej stosowana metoda), (b) czterochlorek węgla z

trifenylfosfiną oraz TEA (warunki odwadniania Appela), (c) fosgen (ClCOOCl) i jego pochodne (difosgen - ClCOOCCl₃, trifosgen - (Cl₃CO)₂CO) z *N*-metylmorfoliną (NMM) lub TEA, (d) odczynnik Burgessa, (e) chlorek tionylu (SOCl₂) i inne.³⁷ W większości przedstawionych metod reakcja prowadzona jest w obniżonej temperaturze (-78 °C do -40 °C), a proces oczyszczania produktu wymaga szczególnej ostrożności ze względu na zagrożenie rozkładu izocyjanków w środowisku kwaśnym stosowanym na etapie ekstrakcji. Przedstawione metody odwadniania mają zastosowanie do syntezy większości izocyjanków achiralnych. Natomiast w przypadku izocyjanków chiralnych, a w szczególności pochodnych α -aminokwasowych, warunki wielu z tych metod odwadniania powodują racemizację. Dlatego też najczęściej stosowane środki odwadniające jak POCl₃ czy COCl₂ nie mogą być skutecznie używane do syntezy chiralnych, enancjomerycznie czystych izocyjanków. Istnieje kilka doniesień na temat syntezy enancjomerycznie czystych α -podstawionych izocyjanooctanów, a jedyne środki odwadniające, w obecności których racemizacja nie występuje to difosgen^{38,39} oraz trifosgen⁴⁰ w obecności NMM. W pracy Danishefskiego wykazano, że w przypadku syntezy izocyjanku **59** z estru metylowego (*S*)-fenyloalaniny jedyną skuteczną metodą odwadniania formylowej pochodnej **58** jest zastosowanie trifosgenu z NMM w niskiej temperaturze -78 °C. W ten sposób otrzymano izocyjanek **59** z wysoką wydajnością (82%) oraz proporcją enancjomerów (>99:1). Inne czynniki (tlenochlorek fosforu, fosgen, difosgen, trifosgen w temp. -40 °C) powodowały częściową lub całkowitą racemizację produktu (Schemat 17).⁴⁰

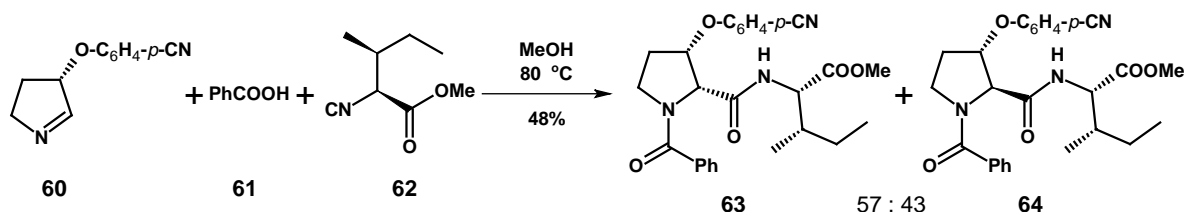


Schemat 17. Odwadnianie *N*-formylo-*O*-metylo-(*S*)-fenyloalaniny.

2.1.4.1. Zastosowanie α -izocyjanooctanów jako substratów do reakcji Ugiego

Poza problemem stabilności konfiguracyjnej izocyjanków w warunkach reakcji odwadniania ryzyko racemizacji pojawia się ponownie w warunkach reakcji Ugiego. Jakkolwiek ryzyko to jest niskie w warunkach multikomponentowej reakcji Passeriniego gdzie stosowanie izocyjanków otrzymanych z α -aminokwasów jest możliwe,³⁸ tak w reakcji Ugiego obserwuje się znaczną lub całkowitą racemizację chiralnych α -podstawionych

izocyjanoocetanów,⁴¹ w tym także izocyjanku **59**. Wyjątkiem jest jeden przykład reakcji Ugiego między chiralnym (3*S*)-(4-cyjanofenoksy)-4,5-dihidropirolelem (**60**) (stosowanym jako cykliczna imina), kwasem benzoesowym (**61**) oraz izocyjankiem **62** otrzymanym z estru metylowego izoleucyny. Produkt otrzymano w postaci mieszaniny tylko dwóch diastereoizomerów **63** i **64** w proporcji 57 : 43 (Schemat 18). Produkty różniły się

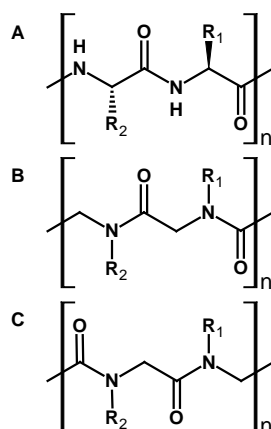


Schemat 18. Reakcja Ugiego bez racemizacji chiralnego izocyjanku.

konfiguracją na węglu w pozycji 2 pochodzącym z pierścienia pirolowego. Racemizacja izocyjanku mogła być powstrzymana bądź poprzez rozbudowaną sterycznie strukturę izocyjanku bądź poprzez zastosowanie wcześniej przygotowanej i wydzielonej cyklicznej iminy i braku w układzie wolnej aminy.

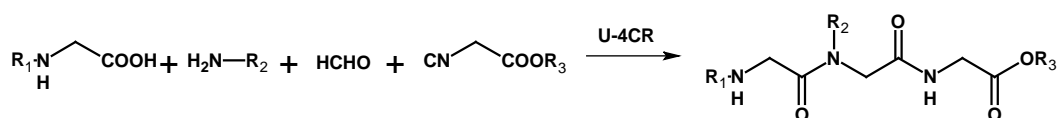
2.1.5. *N*-Podstawione oligoglicyny jako peptoidy otrzymywane w reakcji Ugiego

Szczególną grupą związków, które są pochodnymi peptydów lecz często charakteryzują się lepszymi parametrami fizykochemicznymi są *N*-podstawione oligoglicyny nazywane peptoidami. Peptoidy o strukturze *N*-podstawionych oligoglicyn są związkami, w których aminokwasowe łańcuchy boczne z węgli α przeniesione są na sąsiadujące z nimi atomy azotu. W przypadku retropeptoidów łańcuch oligomeryczny budowany jest w odwrotnym kierunku. Porównanie struktury peptydów oraz peptoidów i retropeptoidów przedstawione jest na Rysunku 1.^{42,43}



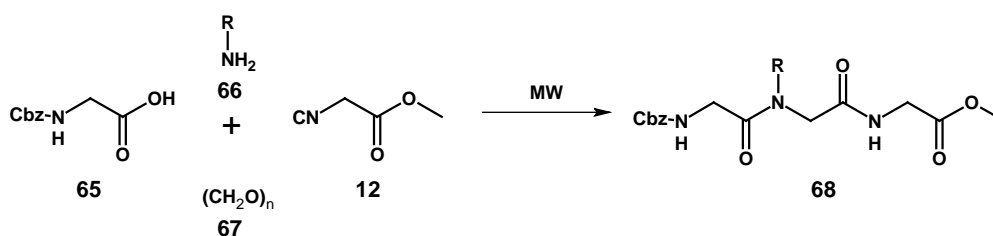
Rysunek 1. Struktura ogólna (A) peptydów, (B) peptoidów, (C) retropeptoidów.

Reakcja Ugiego jest znakomitym narzędziem do syntezy peptoidów o strukturze *N*-aliklowanych oligoglicyn. Głównym założeniem przy stosowaniu reakcji Ugiego do syntezy tego typu związków jest stosowanie jako komponentu karbonylowego najprostszego aldehydu czyli formaldehydu. Formaldehyd stosuje się najczęściej w postaci paraformaldehydu (CH₂O)_n.^{44,45} Rzadziej stosuje się formaldehyd w roztworze metanolem otrzymanym z formaliny, a jego stosowanie ogranicza się do syntezy związków sprzężonych z grupami węglowodanowymi.⁴⁶⁻⁴⁸ Jako pozostałe komponenty na ogół stosuje się *N*-zabezpieczone glicyny jako kwasy, izocyjanooctany jako izocyjanki oraz aminy z resztami stanowiącymi często łańcuchy boczne naturalnych aminokwasów. Formalnie produktem jest tripeptyd Gly-Gly-Gly funkcjonalizowany na *N*- i *C*-końcach oraz posiadający podstawnik R₂ pochodzący od aminy przy jednej grupie peptydowej (Schemat 19).



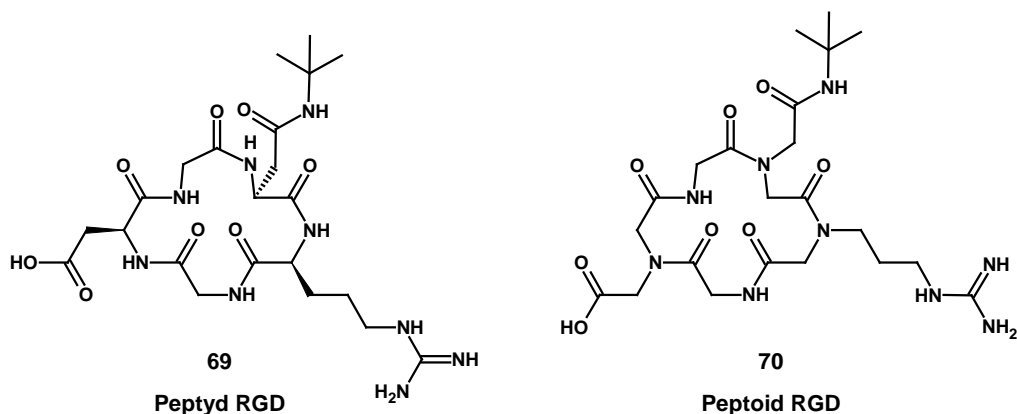
Schemat 19. Zastosowanie reakcji Ugiego do syntezy peptoidów (*N*-podstawionych oligoglicyn).

Metoda ta była ostatnio wykorzystana do wspomaganej mikrofalami syntezy tripeptoidów w reakcji *N*-benzyloksykarbonyloglicyny (**65**), izocyjanooctanu metylu (**12**), paraformaldehydu (**67**) oraz różnych pierwszorzędowych amin **66** (Schemat 20).⁴⁹ Produkty **68** otrzymano z wydajnościami 74 – 91%.



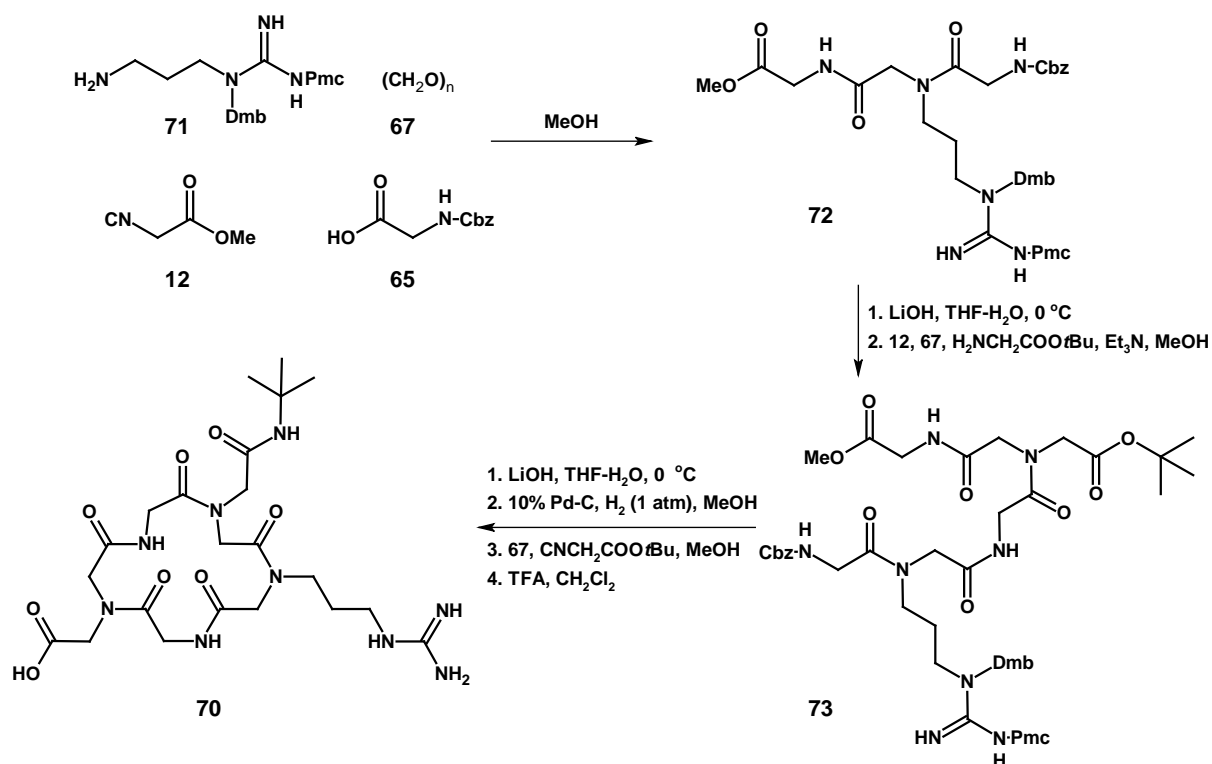
Schemat 20. Zastosowanie reakcji Ugiego do syntezy peptoidów wspomaganych mikrofalami.

Reakcja Ugiego była także wykorzystana do syntezy pochodnych peptoidowych cyklicznego peptydu RGD (arginina–glicyna–kwas asparaginowy) **69**. Peptyd RGD jest ligandem integryn - receptorów występujących na powierzchni komórek i pośredniczących w interakcjach komórek z macierzą pozakomórkową. Jest odpowiedzialny za agregację komórek i ich ukierunkowaną migrację. Peptyd o sekwencji RGD oraz jego peptoidową pochodną **70** przedstawia Rysunek 2. Liniowe peptoidy **72** i **73** były otrzymane w procesie dwóch kolejnych reakcji Ugiego z zastosowaniem paraformaldehydu jako reagenta karbonylowego z wydajnością odpowiednio 68 i 85%. Etapami pośrednimi były odpowiednie



Rysunek 2. Peptyd o sekwencji RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy i jego peptoidowy odpowiednik).

funkcjonalizacje z uwolnieniem grup funkcyjnych biorących udział w reakcji Ugiego jako reagenty. Do wewnątrzcząsteczkowej makrocyklizacji łańcucha peptoidowego **73** zastosowano trzecią reakcję Ugiego wraz z odpowiednią funkcjonalizacją łańcucha, a produkt **70** otrzymano ze stosunkowo niską wydajnością 33% (Schemat 21).⁵⁰ Niska wydajność wewnątrzcząsteczkowej cyklicznej reakcji Ugiego wynika z występowania licznych reakcji ubocznych pomiędzy różnymi cząsteczkami tego samego związku. Reakjom ubocznym można zapobiegać przez odpowiednie rozcieńczenie mieszaniny reakcyjnej. Cykliczny trapeptoid o sekwencji RGD otrzymano również na drodze klasycznej syntezy sprzęgania monomerów na nośniku stałym.⁵¹



Schemat 21. Synteza peptoidu RGD **70** na drodze trzykrotnej reakcji Ugiego.

2.1.6. Podsumowanie zastosowania reakcji Ugiego do syntezy peptydów i peptoidów

Podsumowując część poświęconą zastosowaniu reakcji Ugiego do syntezy związków o strukturze peptydów i peptoidów można stwierdzić, że metody te mają wiele zalet. Jedną z nich jest niespotykana w innych reakcjach szybkość tworzenia dużych, skomplikowanych szkieletów peptydowych wychodząc z prostych, minimalnie zabezpieczonych pochodnych α -aminokwasowych. Ponadto w reakcji Ugiego można wprowadzać dowolne łańcuchy boczne jako reszty środkowego aminokwasu w tripeptydach poprzez odpowiedni dobór aldehydu stosowanego jako substrat. Cechą reakcji Ugiego jest tworzenie nowego centrum stereogenicznego. Produktem reakcji jest zatem mieszanina dwóch enancjomerów lub diastereoizomerów o ile nie następuje racemizacja na żadnym z centrów stereogenicznych substratów użytych do reakcji. Fakt tworzenia mieszanin enancjomerów (diastereoizomerów) można wykorzystać do otrzymania związków o nienaturalnej konfiguracji, należy jednak opracować metodę rozdzielania tych mieszanin.

Należy także zwrócić uwagę na problemy związane ze stosowaniem reakcji Ugiego w syntezie peptydów. Pierwszym z nich jest rozwiązanie problemu budowy szkieletu peptydowego bez *N*-zabezpieczonych wiązań amidowych. Należy zatem dobrać odpowiednie reagenty aminowe, takie jak amoniak lub aminy, z grupami, których usunięcie możliwe jest na drodze prostej przemiany chemicznej. Drugim problemem jest opracowanie metody otrzymywania z α -aminokwasów chiralnych izocyjanków, bez utraty czystości optycznej zarówno na etapie ich syntezy jak i w warunkach reakcji Ugiego. Ponadto izocyjanki powinny posiadać odpowiednie grupy, które po wbudowaniu w strukturę tripeptydów oraz dalszej funkcjonalizacji dadzą C-końcowe grupy funkcyjne odpowiedzialne za aktywność biologiczną danych związków. W momencie rozwiązania tych problemów oraz wykorzystania zalet reakcją Ugiego można wykorzystać do syntezy związków o różnorodnej strukturze opartej na szkielecie peptydowym w tym także różnych stereoizomerów danego związku.

3. Proteasom

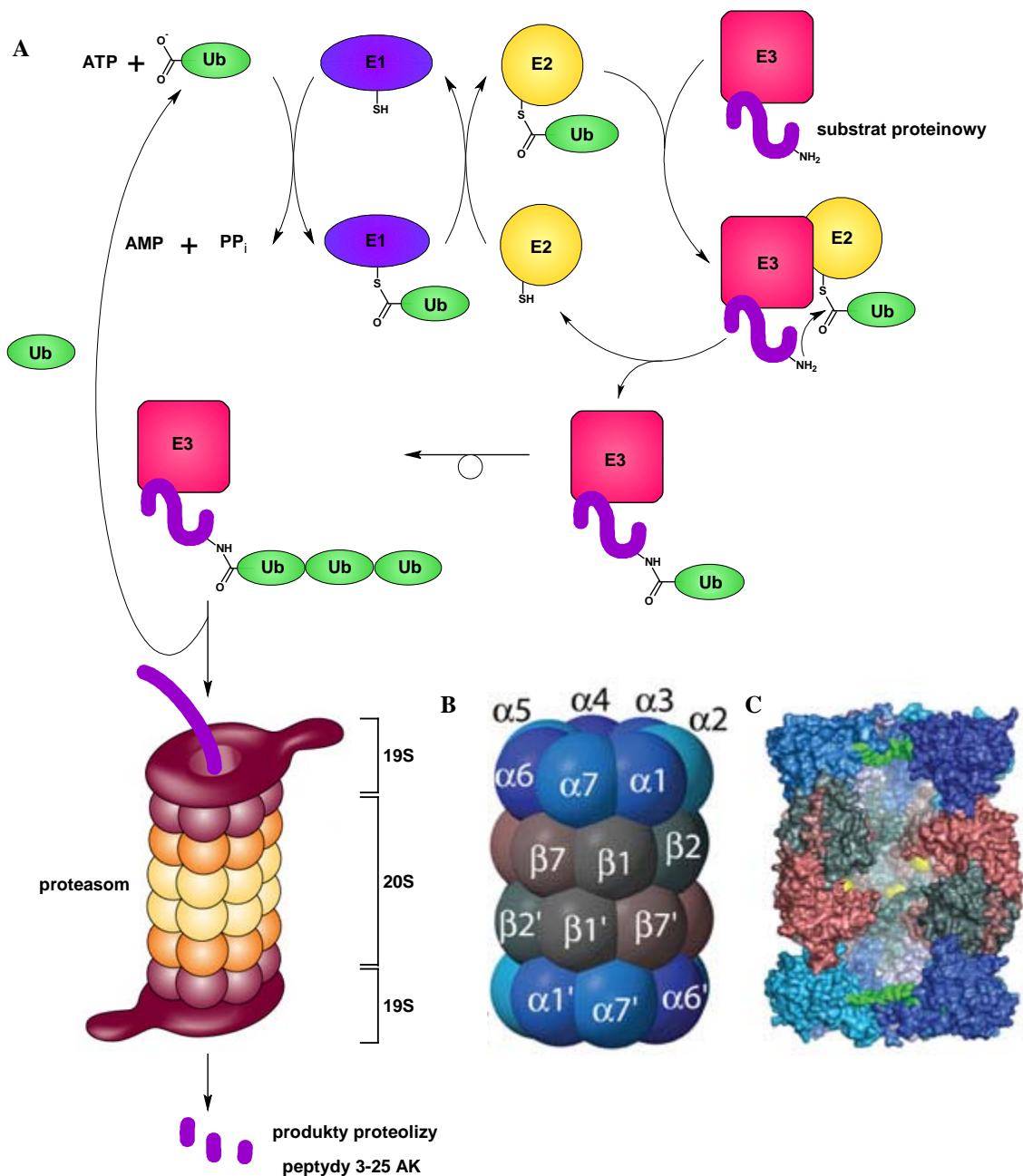
3.1. Funkcje proteasomu w organizmie

Degradacja protein w komórkach eukariotycznych jest szybkim i nieodwracalnym procesem utrzymującym stężenie wewnątrzkomórkowych białek na poziomie umożliwiającym precyzyjną regulację funkcji komórkowych.⁵² Składnikami organizmów powodującymi degradację protein są między innymi enzymy z grupy proteaz katalizujące reakcje nazywane proteolizą. Enzymem proteolitycznym mającym ogromne znaczenie w procesach regulacyjnych komórki jest proteasom, który jest odpowiedzialny za nielizosomalne usuwanie białek uszkodzonych i nieprawidłowo ukształtowanych w wyniku wystąpienia mutacji lub pod wpływem czynników zewnętrznych powodujących stres oksydacyjny.⁵³ Proteasom jest właściwie multikatalitycznym kompleksem endopeptydazy (EC 3.4.25.1), którego pierwszy opis wraz z jego inhibitorami przypisuje się Wilkowi i Orłowskiemu.⁵⁴ Do prawidłowego funkcjonowania proteasom wymaga współdziałania z innym białkiem – ubikwityną, z którą tworzy układ zapewniający wewnątrzkomórkową homeostazę protein. Działanie układu ubikwityna – proteasom poprzez proteolizę prowadzi do kontroli takich procesów jak cykle komórkowe,⁵⁵ rytm dobowy,⁵⁶ przewodnictwo komórek nerwowych⁵⁷ czy też transkrypcja.⁵⁸ Istotne okazały się badania, które wykazały, że inhibicja aktywności proteasomów wywołuje apoptozę wielu typów komórek rakowych jednocześnie wykazując niską cytotoksyczność wobec komórek bez zmian nowotworowych.^{59,60} Układ ubikwityna – proteasom bierze udział w rozkładzie ponad 90% białek komórkowych. Proteasom jest głównym składnikiem tego układu i kontrola jego aktywności ma ogromne znaczenie w prawidłowym przebiegu wielu kluczowych procesów biologicznych. Dlatego też związki wywołujące inhibicję lub aktywację działania proteasomu stanowią narzędzie do badań nad funkcjami układu ubikwityna – proteasom oraz pełnią rolę struktur wiodących w projektowaniu nowych selektywnych inhibitorów z perspektywą na opracowanie nowych leków. Na celowość badań nad poznaniem fundamentalnych zasad rządzących mechanizmem proteolizy białek wskazuje fakt uhonorowania w 2004 roku Aarona Ciechanovera, Avrama Hershko i Irvina Rose Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii za odkrycie ubikwitynozależnej degradacji protein.⁶¹

3.2. Mechanizm biologicznej aktywności układu ubikwityna-proteasom

Proces degradacji protein składa się z trzech zasadniczych etapów: rozpoznanie zbędnego substratu i jego znakowanie przez ubikwitynę (Ub), wykrywanie znakowanych substratów przez proteasom oraz proteoliza znakowanych substratów (Schemat 22).

Ubikwityna jest białkiem występującym we wszystkich komórkach eukariotycznych, biorącym udział w modyfikacji posttranslacyjnej protein w celu ich nieizosomalnej proteolizy. Ubikwityna jest łańcuchem polipeptydowym składającym się z 76 aminokwasów. Struktura pierwszorzędowa tego białka jest niemalże niezmienna w zależności od organizmu,



Schemat 22. A - Schemat proteolizy katalizowanej przez proteasom oraz B - model i C - przekrój przez katalityczną część proteasomu 20S (kolorem żółtym zaznaczone miejsca aktywne w podjednostkach β1, β2 i β5).⁶³

a różnice obserwowane są jedynie na czterech aminokwasach. Ubikwityna łączy się ze zbędnymi, zniszczonymi lub starymi proteinami w wyniku ATP-zależnej reakcji katalizowanej przez kaskadę trzech enzymów:

- E1 – enzym aktywujący ubikwitynę: katalizuje tworzenie wysokoenergetycznego wiązania tioestrowego między E1 a ubikwityną (E1-Ub),
- E2 – enzym sprzęgający ubikwitynę: katalizuje reakcję trans(tio)estryfikacji prowadząc do transferu ubikwityny z E1 do E2 tworząc kompleks E2–ubikwityna (E2-Ub), oraz
- E3 – ligaza ubikwitynowa: wykrywa substrat tworząc z nim kompleks E3–S, następnie łączy się z E2 w kompleksie E2–Ub i katalizuje utworzenie wiązania między resztą lizynową substratu a ubikwityną.

Proces ten prowadzi do poliubikwitynacji substratu co stanowi sygnał do degradacji przez proteasom (Schemat 22A)^{52,62}

3.3. Budowa proteasomu

Proteasomy występują we wszystkich organizmach prokariotycznych i eukariotycznych. Ich struktura bardzo nieznacznie zmienia się w zależności od stopnia rozwoju organizmów, w których występują. W pracy zostanie przedstawiona struktura i mechanizm działania proteasomu ludzkiego.

3.3.1. Proteasom 26S

Proteasom jest dużym kompleksem białkowym zbudowanym z ponad 30 łańcuchów polipeptydowych o łącznej masie cząsteczkowej równej ok. 2000 kDa.⁶³ Stała sedimentacji tego kompleksu wynosi 26S (26 Svedbergów) dlatego też opisuje się go jako proteasom 26S. Składa się on z dwóch zasadniczych części: regulatorowej – proteasom 19S oraz katalitycznej – proteasom 20S (Schemat 22B i 22C).⁶⁴⁻⁶⁶

3.3.1.1. Proteasom 19S

Zadaniem proteasomu 19S jest rozpoznawanie oraz rozwijanie protein, które w wyniku znakowania cząsteczkami ubikwityny stanowią substraty w reakcji degradacji katalizowanej przez proteasom 20S. Proteasom 19S, w skład którego wchodzi 19 białek, zbudowany jest z dwóch różniących się funkcją części: podstawy oraz wieka. Wieko odpowiedzialne jest za rozpoznanie substratu oraz rozkład łączącego się z nim łańcucha

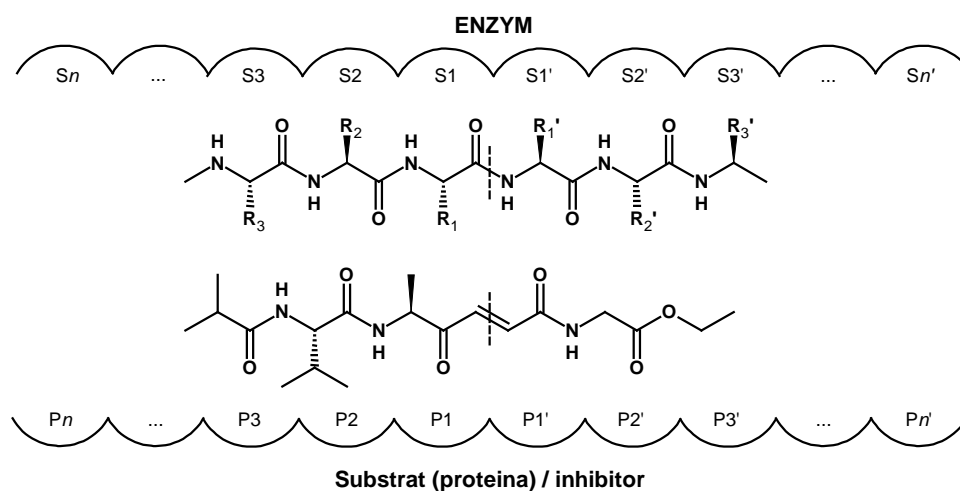
poliubikwitynowego. W jego skład wchodzi 10 protein. Podstawa proteasomu 19S składa się z 9 protein, wśród których wyróżnić można sześć ATPaz bezpośrednio oddziałujących z podjednostką α proteasomu 20S. Wspomagają one energozależne rozwijanie łańcucha peptydowego substratu, otwieranie kanałów pierścienia α proteasomu 20S oraz przenoszenie substratu do komory w obrębie podjednostek β tego proteasomu. W skład jednego proteasomu 26S wchodzi dwa proteasomy 19S (Schemat 22A).⁶⁷

3.3.1.2. Proteasom 20S

Proteasom 20S jest polipeptydem o masie ok. 700 kDa i jest jednym z podstawowych składników komórkowych stanowiąc ok. 1% masy wszystkich białek w komórce. Posiada strukturę w kształcie cylindra składającego się z 28 podjednostek ułożonych w cztery heptameryczne pierścienie, przy czym każdy z nich zbudowany jest z 7 podjednostek α lub β (Schemat 22B). Dwa zewnętrzne pierścienie zbudowane z podjednostek α 1–7 mają charakter strukturalny. Pozostałe dwa pierścienie leżące wewnątrz składają się z podjednostek β 1–7, wśród których β 1, β 2 i β 5 wykazują właściwości katalityczne.⁶⁸ Badania rentgenograficzne proteasomu 20S wykazały, że kształt pierścieni ułożonych w sekwencji $\alpha\beta\beta\alpha$ determinuje strukturę cylindra o długości 150 Å. Posiada on wolny kanał biegnący przez środek.⁶⁹ Wejście do kanału jest bardzo wąskie i ma szerokość 13 Å, natomiast wewnątrz znajduje się komora o szerokości 53 Å, w obrębie której usytuowane są centra aktywne enzymu. Składają się one z 6 reszt aminokwasowych treoniny kluczowych w procesie katalizy reakcji proteolizy. Są one rozmieszczone w trzech podjednostkach każdego z pierścieni β (Schemat 22C).^{70,71} Wąski dostęp do centrum aktywnego enzymu pociąga za sobą konieczność wstępnego rozwinięcia struktury hydrolizowanego białka z udziałem proteasomu 19S.

Każda z występujących w proteasomie 20S podjednostek β wykazujących właściwości katalityczne posiada inny rodzaj aktywności. Każda z podjednostek β 1, β 2 i β 5 posiada N-końcową treoninę (Thr1), której obecność jest kluczowa do osiągnięcia aktywności proteolitycznej enzymu i która stanowi jego zasadnicze centrum aktywne. Grupa hydroksylowa łańcucha bocznego treoniny odpowiedzialna jest za nukleofilowy atak na węgiel karbonylowy wiązania peptydowego, natomiast rodzaj wiązania peptydowego, na które następuje atak determinuje obecność innych łańcuchów bocznych aminokwasów tworzących tak zwane wnęki wiążące.

Zgodnie z modelem dla proteaz stworzonym przez Schechtera i Bergera wnęki opisywane są symbolami S_1, S_2, \dots, S_n i S_1', S_2', \dots, S_n' odpowiadającymi miejscom wiążącym reszty aminokwasowe substratu (liganda) występującym przed (P_1, P_2, \dots, P_n) i po (P_1', P_2', \dots, P_n') hydrolizowanym wiązaniu peptydowym (P_1-P_1') (Rysunek 3).⁷² Symbole P_n i P_n' stosowane są również do opisu reszt występujących w peptydowych inhibitorach enzymów proteolitycznych. Analogicznie numerowanie tych reszt rozpoczyna się od miejsca (wiązania), które bierze udział w tworzeniu kowalencyjnego wiązania z enzymem (Rysunek 3). Wiadomo, że nie każdy związek może być dowolnie hydrolizowany w reakcji katalizowanej danym enzymem. To samo twierdzenie odnosi się do inhibitorów, co oznacza, że nie każdy inhibitor może oddziaływać z enzymem jednocześnie hamując jego aktywność biologiczną. Wiąże się to z definicją farmakofora. Farmakofor jest to zestaw sterycznych oraz elektronowych właściwości związku, których występowanie jest niezbędne do zapewnienia optymalnych supramolekularnych oddziaływań ze specyficznym biologicznym celem (enzymem) z osiągnięciem zamierzonej aktywności biologicznej lub jej inhibicji. Farmakofor nie oznacza struktury konkretnego związku, a raczej wskazuje grupę związków posiadających zbliżone, określone grupy funkcyjne oraz co za tym idzie właściwości.⁷³ Tak więc do osiągnięcia zamierzonego działania enzymu (aktywność proteolityczna lub jej inhibicja) potrzebna jest obecność odpowiednich grup funkcyjnych w pozycjach P_1-P_n i $P_1'-P_n'$ substratu lub inhibitora specyficznego oddziałującego z kieszeniami S_1-S_n i $S_1'-S_n'$ enzymu. Zatem w strukturze substratu lub inhibitora kluczową rolę ma zarówno rodzaj łańcuchów bocznych aminokwasów wchodzących w skład łańcucha peptydowego jak i konfiguracja absolutna na centrach stereogenicznych poszczególnych aminokwasów.



Rysunek 3. Schematyczny model proteaz z oznaczonymi wnękami oddziałującymi z resztami substratów oraz przykładowego inhibitora; linią przerywaną wskazano w substracie miejsce działania hydrolitycznego enzymu oraz w inhibitorze miejsce, w którym następuje utworzenie kowalencyjnego wiązania z enzymem.

3.3.1.2.1. Selektywność podjednostek β proteasomu 20S

Najistotniejszą różnicą w budowie podjednostek β proteasomu wpływającą na selektywność danej podjednostki jest łańcuch boczny w pozycji 45. Znajduje się on we wnęce wiążącej S1, w której usytuowuje się łańcuch boczny aminokwasu sąsiadujący z hydrolizowanym wiązaniem peptydowym P1.⁷⁴ W ten sposób rozróżniamy trzy selektywne aktywności charakterystyczne dla każdej podjednostki:

- chymotrypsynopodobna (ang. chymotrypsin-like) dla $\beta 5$ (reszta Met45): hydroliza wiązania peptydowego występującego po aminokwasie z rozbudowanym, hydrofobowym łańcuchem bocznym,
- trypsynopodobna (ang. trypsin-like) dla $\beta 2$ (reszta Gly45): hydroliza wiązania peptydowego występującego po aminokwasie z zasadowym łańcuchem bocznym,
- kaspazopodobna (ang. caspase-like), pokwasowa (ang. postacidic) lub peptydylo-glutamylova hydrolizująca peptydy (ang. peptidyl-glutamyl peptide hydrolyzing, PGPH) dla $\beta 1$ (reszta Arg 45): hydroliza wiązania peptydowego występującego po aminokwasie z kwaśnym łańcuchem bocznym.^{65,67}

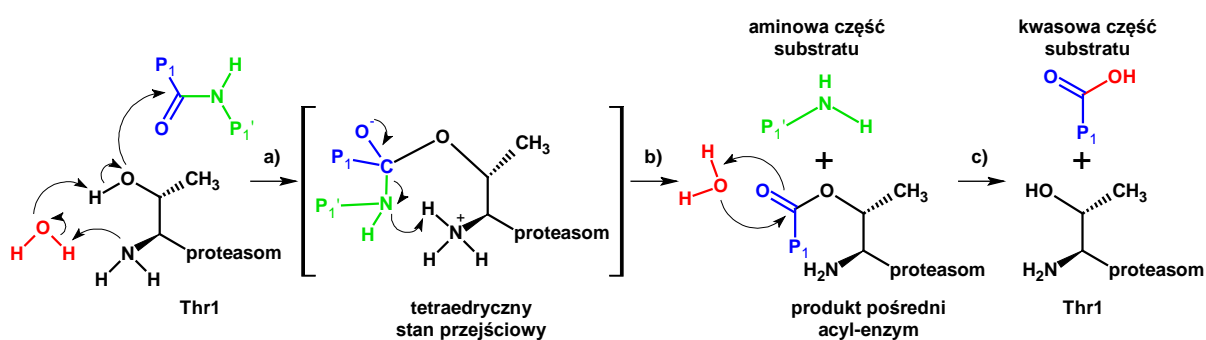
Różnorodność selektywności powoduje, że proteasom jest zdolny do zhydrolizowania niemal każdego wiązania w łańcuchu peptydowym. Produktami proteolizy katalizowanej przez proteasom są oligopeptydy o długości łańcuchów składających się od 3 do 25 aminokwasów, ze średnią ilością 8 do 12 aminokwasów w łańcuchu.⁷⁴

Wykazano, że inhibicja lub inaktywacja poprzez mutację podjednostki $\beta 5$ powoduje znaczny spadek aktywności proteolitycznej proteasomu. Podobnych zależności nie obserwowano jednak dla aktywności podjednostek $\beta 1$ oraz $\beta 2$. Wyniki te wskazują na kluczowe znaczenie aktywności chymotrypsynowej dla ogólnej proteolizy katalizowanej przez proteasom.⁷⁵ Inne badania wykazały, że do inhibicji degradacji protein w komórkach raka szyjki macicy HeLa, której rezultatem jest apoptoza tych komórek i działanie przeciwnowotworowe, potrzebne jest blokowanie wszystkich centrów aktywnych w podjednostkach $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$ w proteasomie.⁷⁶

W kolejnej części pracy szczegółowo przedstawiony zostanie mechanizm proteolizy katalizowanej przez proteasom oraz inhibicja tego enzymu z podziałem na grupy inhibitorów i ich działanie.

3.4. Mechanizm działania proteasomu

Jak wspomniano w poprzedniej części pracy obecność reszt treoninowych Thr1 w podjednostkach $\beta 1$, $\beta 2$, i $\beta 5$ ma kluczowe znaczenie w osiągnięciu aktywności proteolitycznej proteasomu 20S. N-Końcowa treonina posiada grupę hydroksylową, która bierze udział w nukleofilowym ataku na wiązanie peptydowe w proteinach. Tym samym aktywne podjednostki β proteasomu należą do grupy hydrolaz, w strukturze których na N-końcu łańcucha peptydowego znajdują się aminokwasy posiadające nukleofilowe łańcuchy boczne (treonina, seryna lub cysteina). Przykładem tego typu enzymów jest acylaza penicylinowa (z N-końcową grupą serynową) oraz glutamino (5-fosforybozylo-1-pirofosforano) amidotransferaza (z N-końcową grupą cysteinową). Reszta N-końcowa tych enzymów stanowi ich centrum aktywne, w którym grupa hydroksylowa lub sulfhydrylowa pełni funkcję katalitycznego nukleofila, a reszta aminowa zasady w reakcji hydrolizy. Poniżej przedstawiono mechanizm proteolizy katalizowanej przez proteasom (enzym z N-końcową grupą treoninową) (Schemat 23).⁶⁵



Schemat 23. Mechanizm proteolizy katalizowanej przez proteasom; a) atak nukleofilowy, b) tworzenie acylozanego enzymu, c) hydroliza acylozanego enzymu.

Pierwszym etapem proteolizy jest deprotonowanie grupy hydroksylowej łańcucha bocznego Thr1 proteasomu katalizowane przez N-końcową grupę aminową, która jest akceptorem protonu. Następnie w wyniku nukleofilowego ataku anionu alkoholowego aktywowanego proteasomu na węgiel karbonylowy wiązania peptydowego hydrolizowanego łańcucha peptydowego powstaje tetraedryczny stan przejściowy. W kolejnym etapie w wyniku przegrupowania następuje odłączenie aminowej części substratu (z wolną N-końcową grupą aminową). W ostatnim etapie następuje hydroliza produktu pośredniego z uwolnieniem kwasowej części substratu (z wolną C-końcową grupą karboksylową) oraz cząsteczki katalizatora czyli proteasomu (Schemat 23).

3.5. Inhibicja proteasomu

Zasadniczym warunkiem inhibicji proteasomu jest zablokowanie grupy Thr1 poprzez utworzenie najczęściej kowalencyjnego wiązania między jej grupami funkcyjnymi (hydroksylowa i aminowa) a inhibitorem. Wiązanie to może być tworzone w sposób odwracalny lub nieodwracalny, co z kolei zależy od grup funkcyjnych występujących w inhibitorze.

Po odkryciu mechanizmu działania proteasomu przebadano szereg związków pod kątem ich zdolności hamowania funkcji tego enzymu. Inhibitory proteasomów można podzielić ze względu na ich pochodzenie tj.: (a) otrzymywane syntetycznie (struktura oparta na szkielecie małych peptydów liniowych) oraz (b) pochodzenia naturalnego (o szkielecie małych peptydów liniowych, cyklicznych i makrocyklicznych). W zależności od grup funkcyjnych występujących w strukturze inhibitorów różnią się one od siebie sposobem wiązania się z centrum aktywnym, specyficnością oraz odwracalnością wiązania.

Aktywność inhibitora opisuje się kilkoma wielkościami:

- IC_{50} – jest to stężenie inhibitora, przy którym obserwuje się 50% spadek aktywności enzymu (proteasomu);

- LC_{50} , LC_{80} – stężenie inhibitora, przy którym następuje 50%, 80% zahamowanie wzrostu komórek;

- EC_{50} – stężenie inhibitora, które odpowiada połowie różnicy aktywności między linią bazową (najmniejsza odpowiedź enzymu po dodaniu inhibitora) a maksymalną odpowiedzią;

- K_i – stała inhibicji – jest to stężenie inhibitora, które jest potrzebne do obniżenia maksymalnej szybkości reakcji katalizowanej przez enzym (proteasom) do 50% jej wartości.

3.5.1. Przegląd inhibitorów proteasomów

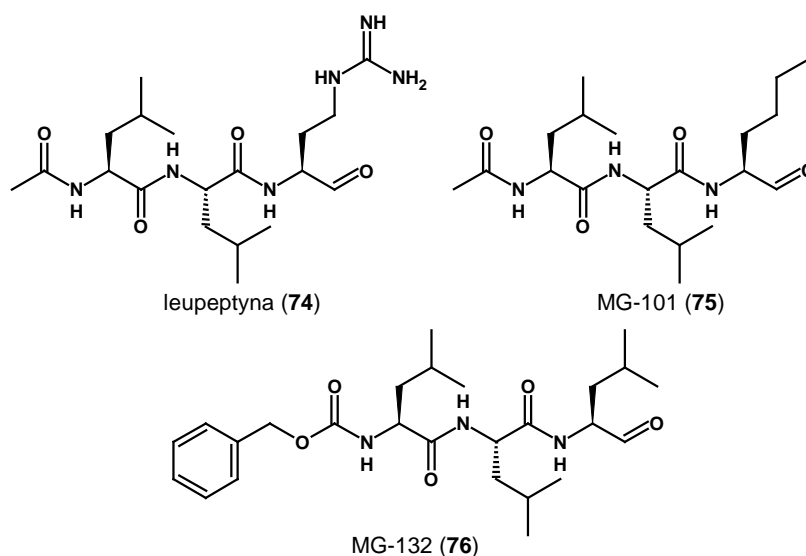
Przeważająca część inhibitorów proteasomów ma strukturę małych peptydów zbudowanych z 2 do 4 aminokwasów, a poszczególne ich klasy różnią się grupami funkcyjnymi występującymi na C-końcu łańcucha. Wyróżnia się zatem następujące główne, bardziej liczne grupy inhibitorów proteasomów o szkielecie peptydowym:

- peptydowe aldehydy;
 - peptydowe kwasy boronowe;
 - peptydowe epoksyketony;
 - peptydowe winylosulfony;
- oraz inne, mniej liczne grupy.

Poniżej opisane zostaną poszczególne grupy inhibitorów z przedstawieniem aktywności, selektywności oraz przykładowych syntez ich przedstawicieli. Szczegółowe metody syntezy wybranych tripeptydów przedstawione zostaną w dalszej części pracy.

3.5.1.1. Aldehydy

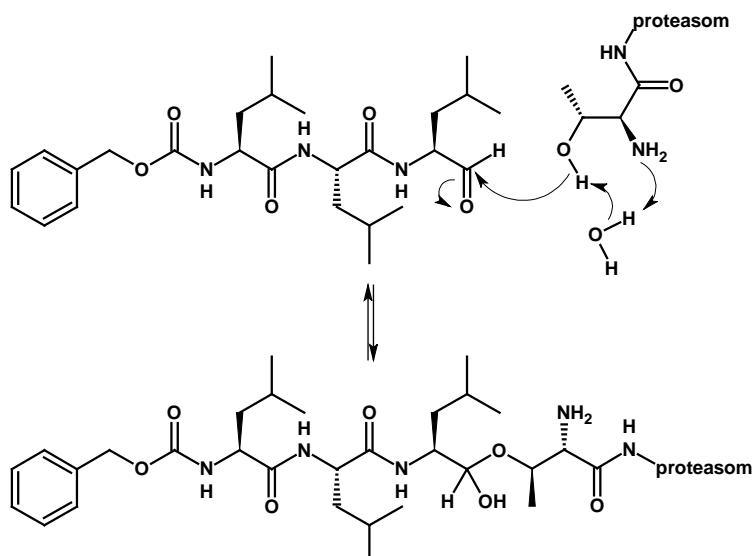
Historycznie pierwszą klasą inhibitorów proteasomów były syntetyczne aldehydy peptydowe co spowodowane było ich szeroką dostępnością komercyjną w latach 80-tych ubiegłego wieku. Wstępnie aldehydy peptydowe zostały zidentyfikowane jako inhibitory proteaz serynowych i cysteinowych. Pierwszym przedstawicielem tej grupy związków była leupeptyna (Ac-Leu-Leu-Arg-al, **74**), która wcześniej była znana jako inhibitor proteaz serynowych: trypsyny⁷⁷ i plazminy⁷⁸ oraz cysteinowych: papainy⁷⁹ i katepsyny B.⁸⁰ Leupeptyna posiada powinowactwo do podjednostki $\beta 2$ proteasomu posiadającej selektywność trypsynopodobną. Pod koniec lat 90-tych ubiegłego stulecia największy wkład w syntezę nowych inhibitorów opartych o szkielet peptydowy oraz ich zastosowanie w badania inhibicji proteasomu mają współpracujący ze sobą Julian Adams i Ross Stein.^{63,81-83} Związki opracowane przez ich zespoły otrzymywały najczęściej stosowaną obecnie w literaturze numerację MG-XXX. Pierwszym inhibitorem z tej grupy jest opracowany przez Adama i Steina inhibitor kalpainy I (Ac-Leu-Leu-nLeu-al, MG-101, ALLN, **75**) powodujący również hamowanie aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu. Związek ten jest jednak około 25-krotnie bardziej aktywny jako inhibitor katepsyny B i kalpainy wobec czego nie jest inhibitorem selektywnym. Badania rentgenograficzne tego inhibitora doprowadziły do identyfikacji miejsc aktywnych w proteasomie wydzielonym z *Saccharomyces cerevisiae* i



Rysunek 4. Przykłady inhibitorów proteasomów jako małych peptydów z C-kończącą grupą aldehydową.

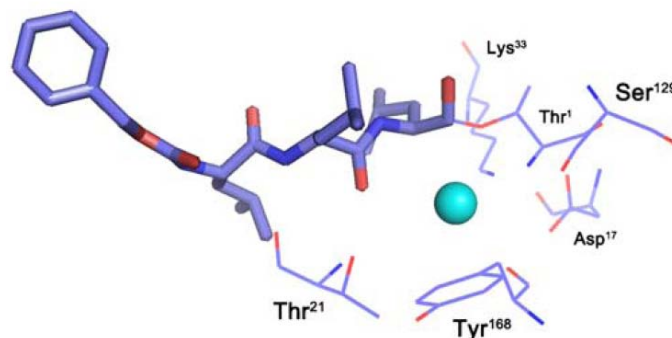
Thermoplasma acidophilum.^{84,68} Badania te pozwoliły opracować model farmakofora dla inhibitorów proteasomów, w efekcie czego projektowanie nowych aktywnych inhibitorów stało się możliwe. Najbardziej rozpowszechnionym, a zarazem najszerzej i najlepiej zbadanym przedstawicielem zarówno tej jak i całej grupy inhibitorów proteasomów jest MG-132 (Cbz-Leu-Leu-Leu-al, Z-LLL-H, **76**). Jest on inhibitorem odwracalnym dającym bardzo szybko odpowiedź. Dodatkowo w porównaniu do innych bardziej specyficznych inhibitorów jest stosunkowo tani (ok. 600 PLN / 5 mg). Wykazuje selektywną inhibicję aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu ($K_i = 4$ nM) przy czym jego aktywność jest znacznie silniejsza niż w przypadku MG-101 ($K_i = 140$ nM).^{81,85} Do inhibicji innych enzymów (kalpajny i katepsyny) potrzebne są 10-krotnie wyższe stężenia tego inhibitora co wskazuje na specyficzne hamowanie aktywności proteasomu.⁸⁶ Właściwości MG-132 powodują również, że jest on najczęściej stosowany w badaniach wpływu inhibicji proteasomu na przebieg wielu procesów na poziomie komórkowym i tkankowym oraz jako odnośnik w badaniach nowych inhibitorów proteasomów. Inne aldehydy peptydowe jak MG-101, PSI (Cbz-Ile-Glu(O t -Bu)-Ala-Leu-al) czy MG-112 (Cbz-Leu-Leu-nVal-al) mogą być stosowane jako odnośniki w badaniach inhibicji enzymów jednakże nie dają one jednoznacznych wyników. Efekty ich aktywności wywołane na poziomie komórkowym mogą być rezultatem inhibicji enzymów innych niż proteasom. Pomimo, że MG-132 jest bardziej selektywny, wyniki badań, w których mechanizm hamowania czynności komórkowych jest niepewny, powinno się popierać dodatkowymi badaniami z zastosowaniem bardziej specyficznych inhibitorów. Przykładem takich związków są opisane w dalszej części, posiadające inne grupy funkcyjne laktacystyna, epoksomycyna lub kwas boronowy (MG-262). Jednakże stosowanie tych inhibitorów we wszystkich rutynowych badaniach byłoby zdecydowanie zbyt kosztowne.

Mechanizm inhibicji proteasomu przez aldehydy peptydowe polega na utworzeniu odwracalnego wiązania kowalencyjnego między grupą aldehydową inhibitora a grupą hydroksylową reszty Thr1 enzymu dając w efekcie ugrupowanie hemiacetalowe w kompleksie proteasom – inhibitor proteasomu (Schemat 24).^{65,62} Zablokowanie reszty Thr1 w proteasomie jest warunkiem koniecznym do uzyskania aktywności tego typu inhibitorów. Aktywność poszczególnych inhibitorów o strukturze tripeptydów z N-kończącą grupą zabezpieczającą zależy natomiast od charakteru łańcuchów bocznych w pozycjach P1, P2 i P3 oraz rodzaju grupy zabezpieczającej opisywanej jako P4.



Schemat 24. Mechanizm inhibicji proteasomu przez aldehyd tripeptydowy na przykładzie MG-132.

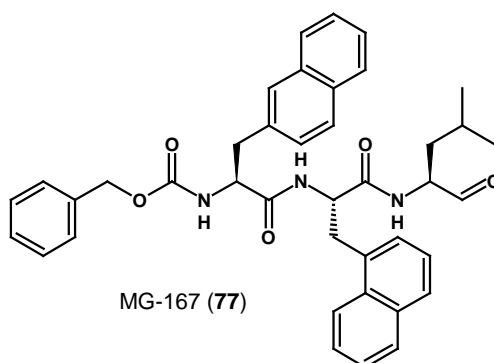
Ostatnie badania z wykorzystaniem dynamiki molekularnej kompleksów proteasom – inhibitor proteasomu (MG-101 i MG-132) dostarczyły wyniki, które potwierdziły dotychczasowe doniesienia na temat faworyzowanych podstawników w strukturze inhibitora, a także dostarczyły nowe rezultaty, które w badaniach zależności struktura – aktywność (ang. structure-activity relationship, SAR) pozwolą opracować nowe, bardziej aktywne inhibitory.⁸⁷ Na podstawie tych oraz poprzednich badań doświadczalnych⁸¹ i obliczeniowych⁸⁸ określono, że największy wpływ na aktywność i selektywność inhibitora ma jego oddziaływanie z wnękami S1 i S3 proteasomu. Jednakże dokładny mechanizm oddziaływania grup funkcyjnych tych wnęk z łańcuchami P1 i P3 nie jest dobrze poznany. Obecność średniej wielkości, rozbudowanej grupy izobutyłowej (reszta leucynowa) w pozycji P1 inhibitora wydaje się kluczowym warunkiem do osiągnięcia wysokiej aktywności. Obserwuje się również wzrost aktywności w momencie wprowadzenia w pozycję P2 obszernej, sterycznie rozbudowanej grupy (najlepiej aromatycznej takiej jak naftylowa). W ten sposób następuje wypełnienie wnęki S2 co może zapobiegać wnikaniu do niej cząsteczki wody. W przypadku obecności mniejszych grup, niewypełniających wnęki S2, cząsteczka wody, która ma możliwość dostania się do wnęki, bierze udział w rozkładzie kompleksu proteasom – inhibitor co doprowadza do odzyskania cząsteczki proteasomu i jednocześnie zmniejszenia aktywności inhibitora (Rysunek 5).⁸⁷ Również w pozycji P3 inhibitora preferowana jest obecność rozbudowanej, bogatej w elektrony grupy. Tutaj także najlepsze efekty daje wprowadzenie grupy aromatycznej (naftylowej).



Rysunek 5. Cząsteczka wody (niebieska) we wnęce S2 w dostępie do wiązania kowalencyjnego kompleksu proteasom – MG-132.⁸⁷

Istotne znaczenie w osiągnięciu wysokiej aktywności inhibitora ma także charakter grupy zabezpieczającej N-koniec tripeptydu. Wykazano, że preferowana jest obecność obszernej grupy aromatycznej połączonej z N-końcem 2-4 atomowym łącznikiem. Jest to spowodowane obecnością we wnęce S4 proteasomu łańcuchów bocznych z pierścieniami aromatycznymi i alifatycznymi, które tworzą z pierścieniem aromatycznym inhibitora oddziaływania hydrofobowe CH/ π oraz π/π .

Zgodnie z wyżej przedstawionymi zależnościami aktywności od struktury opracowano najbardziej aktywną strukturę inhibitora proteasomu na bazie aldehydu tripeptydowego **77** (Cbz-2Nal-1Nal-Leu-al, MG-167) ($K_i = 0,015$ nM). Ma on dwie duże reszty naftyloalaninowe w łańcuchach bocznych w pozycjach P2 oraz P3, a także resztę leucynową w pozycji P1 i grupę benzyloksykarbonylową zabezpieczającą N-koniec (Rysunek 6).^{82,81} Pomimo wysokiej aktywności związku tego typu nie hamują specyficznie aktywności proteasomu, dlatego też nie mają one zastosowania w dalszych badaniach.



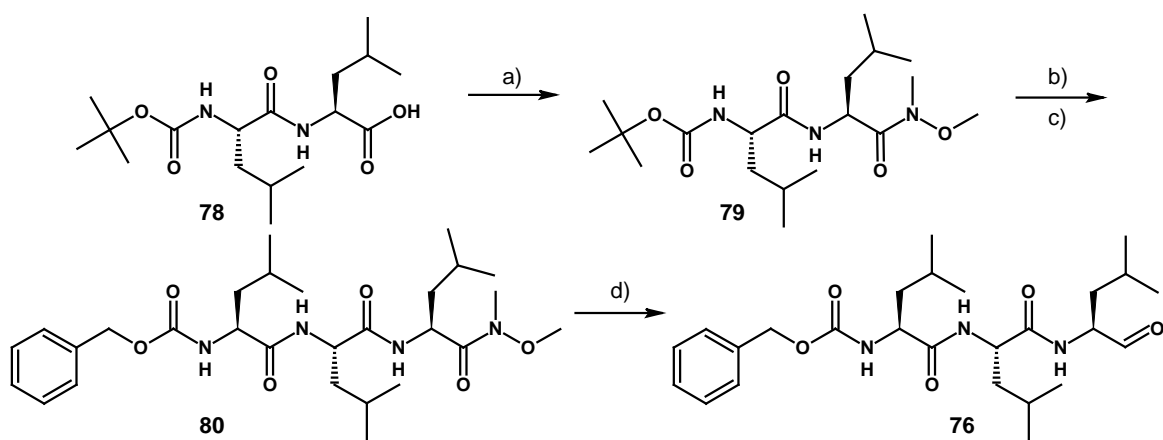
Rysunek 6. MG-167 – najbardziej aktywny inhibitor proteasomu o strukturze aldehydu tripeptydowego.

Istnieje wiele opisów przeciwnowotworowego działania aldehydów tripeptydowych. MG-132 między innymi indukuje apoptozę i hamuje wzrost komórek złośliwych międzybłoniaka opłucnej,⁸⁹ raka piersi,⁹⁰ raka prostaty⁹¹ i mięsaka kostnego⁹² (najbardziej powszechnego ze złośliwych nowotworów kości, najczęściej występującego u dzieci i

młodzieży). Według ostatnich doniesień MG-132 powoduje również sensybilizację komórek rakowych na promieniowanie jonizujące⁹¹ oraz skutecznie zapobiega rozwojowi tolerancji morfinowej u szczurów.⁹³

Generalnie, aldehydy peptydowe są bardzo aktywnymi inhibitorami proteasomu, łatwo przenikającymi błony komórkowe i wciąż często używanymi w badaniach biologicznych. Jednakże z powodu obecności wysoko reaktywnej grupy aldehydowej związki tego typu nie są specyficzne i istnieją ograniczenia ich zastosowania jako terapeutyki oraz próbniki w badaniach szlaków sygnalizacyjnych.

Synteza inhibitorów proteasomów o strukturze aldehydów tripeptydowych takich jak MG-132 oraz jego analogów rozpoczyna się od wprowadzenia prekursora grupy aldehydowej w postaci amidu Weinreba (kwasu *N,O*-dimetylohydroksamowego),⁹⁴ do struktury *N*-zabezpieczonego dipeptydu (Boc-Leu-Leu-OH) (**78**) poprzez sprzężanie wolnej C-końcowej grupy karboksylowej z *N,O*-dimetylohydroksyloaminą. Następnie po odbezpieczeniu grupy aminowej dipeptyd poddaje się kolejnemu sprzężaniu z *N*-benzyloksykarbonyloleucyną (Cbz-Leu-OH). Ostatnim etapem jest przeprowadzenie amidu Weinreba **80** w aldehyd **76** poprzez redukcję wodorkiem litowo-glinowym (Schemat 25).⁸¹ Reakcja ta nie powoduje epimeryzacji na sąsiadującym centrum stereogenicznym. Opracowane w 1981 roku amidy Weinreba w reakcji z reagentami Grignarda oraz czynnikami organolitowymi są łatwo przekształcane w ketony oraz aldehydy. W przypadku reakcji z LAH głównym produktem jest aldehyd jednak obserwowane jest również powstawanie produktu ubocznego w postaci alkoholu.⁹⁴ Czynnikiem sprzęgającym w obydwu reakcjach jest najczęściej stosowany w chemii peptydów chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC) w obecności 1-hydroksybenzotriazolu (HOBT)



Schemat 25. Synteza tripeptydu aldehydowego MG-132: a) HN(Me)OMe, EDC, HOBT, DMF; b) TFA, CH₂Cl₂; c) Cbz-Leu-OH, EDC, HOBT, NMM, DMF; d) LAH, THF.

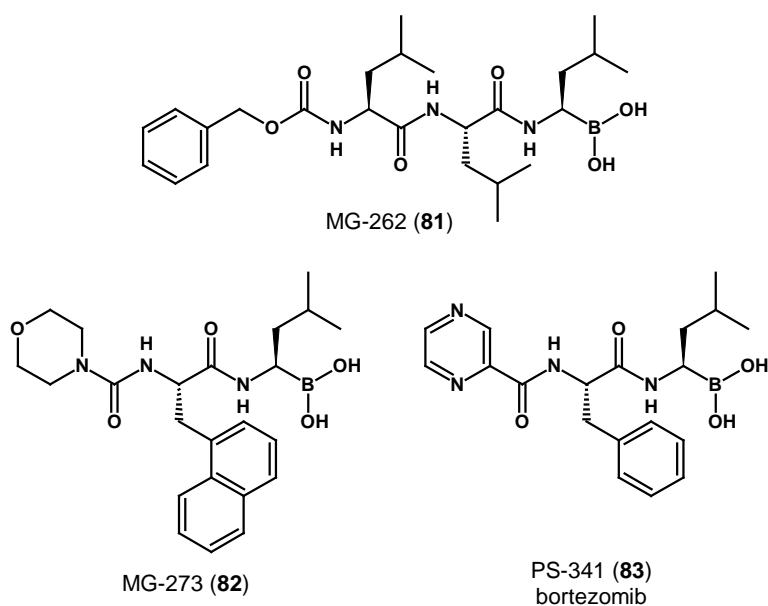
zapobiegającego racemizacji. MG-132 został otrzymany tą metodą z całkowitą wydajnością 32%.⁹⁵ Należy jednak jeszcze dodatkowo uwzględnić proces otrzymywania zabezpieczonego dipeptydu, który był użyty w tej reakcji jako komercyjnie dostępny substrat.

Otrzymane tą metodą tripeptydy z C-końcową grupą aldehydową poza jednym wyjątkiem zbudowane były wyłącznie z aminokwasów o naturalnej konfiguracji. Spośród ośmiu możliwych diastereoizomerów Cbz-Leu-Leu-Leu-al otrzymano tylko dwa, a mianowicie MG-132 o konfiguracji L,L,L oraz jego epimer MG-192 o konfiguracji D,L,L.⁸¹ Mała ilość syntez diastereoizomerów o nienaturalnej konfiguracji wynika z braku komercyjnie dostępnych dipeptydów Cbz-Leu-Leu-OH oraz innych o strukturze Cbz-Aa-Aa-OH, które byłyby zbudowane z aminokwasów o konfiguracji D (Sigma, Aldrich, Merck). Zatem do otrzymania wszystkich diastereoizomerów należy wykonać wieloetapowe syntezę wychodząc z enancjomerycznie czystych α -aminokwasów o konfiguracji D i L.

Pozostałe metody otrzymywania tripeptydów z C-końcową grupą aldehydową zostaną przedstawione w dalszej części pracy.

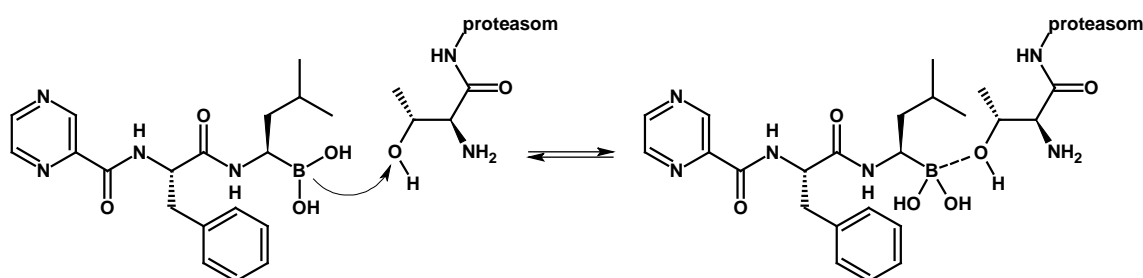
3.5.1.2. Kwasy boronowe

Spośród wszystkich inhibitorów proteasomów największe znaczenie terapeutyczne mają obecnie małe peptydy z N-końcowym ugrupowaniem kwasu boronowego $-B(OH)_2$, które należą do grupy inhibitorów pochodzenia syntetycznego. Jest to spowodowane dużą selektywnością oraz aktywnością tego typu związków. Wzorując się na wysokiej aktywności inhibitorów z grupą aldehydową otrzymano i zbadano tripeptyd Cbz-Leu-Leu-Leu- $B(OH)_2$



Rysunek 7. Przykłady inhibitorów proteasomów jako peptydów z C-końcową grupą kwasu boronowego.

(MG-262, **81**) jako analog struktury MG-132. Związek ten był 100-krotnie bardziej aktywny jako inhibitor proteasomu ($K_i = 0,035$ nM) niż MG-132.^{82,96} Przypuszcza się, że wzrost aktywności spowodowany jest możliwością utworzenia pseudokowalencyjnego wiązania między wolnym orbitalem p atomu boru a wolną parą elektronową atomu tlenu grupy hydroksylowej reszty Thr1 katalitycznie aktywnych podjednostek β proteasomu. Efektem tego jest utworzenie stabilnego tetraedrycznego stanu przejściowego kwasu boronowego z N-kończącą resztą treoninową Thr1 (Schemat 26).⁶² Inhibitory te tworzą kompleksy z proteasomem w sposób odwracalny, przy czym szybkość dysocjacji tworzonego adduktu jest znacznie wolniejsza niż w przypadku adduktów inhibitorów z grupą aldehydową. Prowadzi to do znacznie dłuższej inhibicji proteasomu przez jedną cząsteczkę inhibitora co pociąga za sobą możliwość stosowania w terapii niższych jego stężeń.⁹⁷ Dodatkowo kwasy boronowe są stabilne w większości rozpuszczalników i nie rozkładają się pod wpływem czynników nukleofilowych.



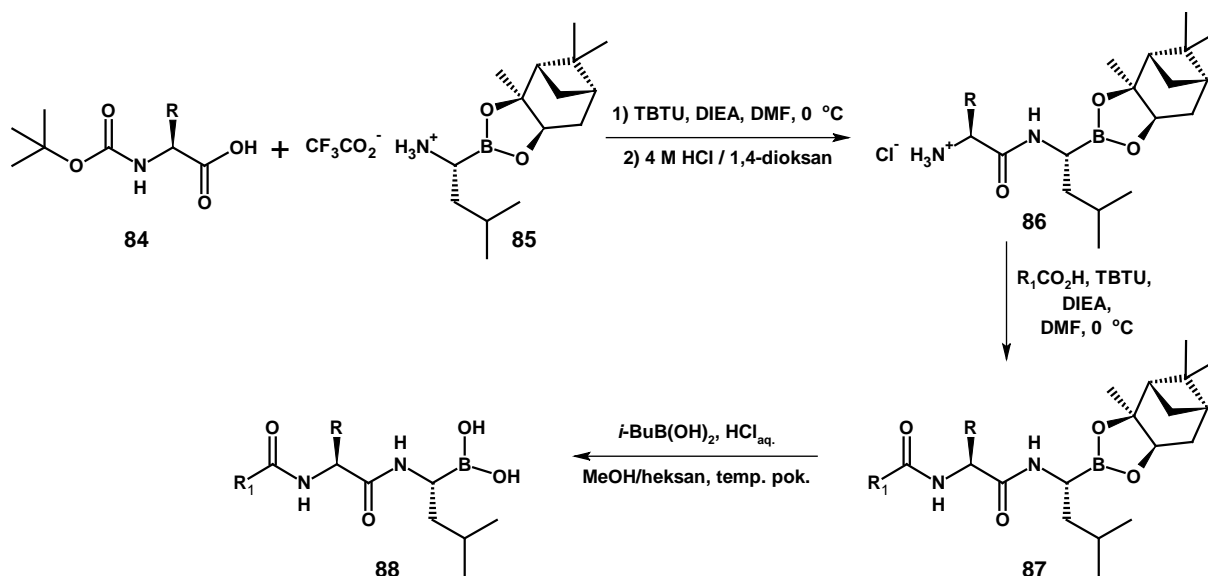
Schemat 26. Mechanizm inhibicji proteasomu przez dipeptyd z grupą kwasu boronowego na przykładzie PS-341.

Wysoka aktywność inhibitorów z grupą kwasu boronowego umożliwiła skrócenie łańcucha peptydowego o jeden aminokwas co spowodowało nieznaczny spadek aktywności ale jednocześnie wzrost selektywności. Do inhibicji innych enzymów takich jak chymotrypsyna czy elastaza niezbędne jest oddziaływanie wnek S3 i S4 tych enzymów z resztami P3 i P4 inhibitora. Dlatego też zredukowana wielkość tych inhibitorów (brak obecności reszty peptydowej P3 oraz reszty P4 w strukturze) pociąga za sobą spadek aktywności względem tych enzymów, a jednocześnie jest powodem wspomnianego wzrostu ich selektywności względem proteasomów. Powoduje to również wzrost rozpuszczalności oraz przenikalności błon komórkowych co jest wymogiem w przypadku projektowania związków o właściwościach terapeutycznych. Należy także zwrócić uwagę na fakt, że w przypadku innych klas inhibitorów proteasomów do osiągnięcia umiarkowanych aktywności łańcuch peptydowy musi zawierać 3-4 aminokwasy.^{98,53}

Najbardziej aktywnym przedstawicielem tej grupy dipeptydowych inhibitorów jest MG-273 (4-Morph-1-Nal-Leu-B(OH)₂, **82**) ($K_i = 0,18$ nM). Z kolei nieco mu ustępujący

aktywnością dipeptyd PS-341 ((2-Pyz)-C(O)-Phe-Leu-B(OH)₂, MG-341, bortezomib, **83**) znalazł zastosowanie praktyczne w medycynie. W niskich, terapeutycznych stężeniach hamuje on specyficznie aktywność podjednostek $\beta 1$ i $\beta 5$ nie wpływając jednocześnie na aktywność podjednostki $\beta 2$ proteasomu.⁹⁹ Bortezomib jako inhibitor proteasomu o wysokiej aktywności ($K_i = 0,62$ nM) oraz specyficzności⁹⁶ po przejściu wszystkich faz badań klinicznych¹⁰⁰⁻¹⁰² został zaakceptowany do użytku w praktyce medycznej oraz wprowadzony w 2003 roku przez firmę Millennium Pharmaceuticals jako lek Velcade®. Velcade® jest stosowany w monoterapii. Jest wskazany do leczenia pacjentów z progresją szpiczaka mnogiego, którzy wcześniej otrzymali co najmniej jeden program leczenia oraz u których zastosowano już transplantację szpiku lub do takiego leczenia nie kwalifikują się.^{103,104} Bortezomib powoduje również akumulację komórek raka prostaty PC-3 w fazie wzrostu G₂-M co w efekcie może doprowadzić do ich apoptozy w wyniku długotrwałego działania inhibitora.⁸³ Ostatnie badania wykazały również podatność raka płuc na aktywność bortezomibu.¹⁰⁵

Dipeptydy z C-kończącą grupą kwasu boronowego **88** otrzymuje się zgodnie z przedstawionym Schematem 27. W pierwszym etapie pochodna leucynowa estru pinanediolowego kwasu boronowego **85** sprzęgana była z *N*-benzyloksykarbonylowanym aminokwasem **84** z TBTU (tetrafluoroboran 2-(1*H*-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy) stosowanym jako czynnik sprzęgający. Odbezpieczenie i acylowanie grupy aminowej prowadziło do otrzymania dipeptydowego estru boronowego **87**. Kwas boronowy **88** otrzymano w reakcji odbezpieczenia estru **87** w dwufazowej reakcji transestryfikacji z kwasem izobutyloboronowym.^{82,106} Do osiągnięcia wysokiej aktywności

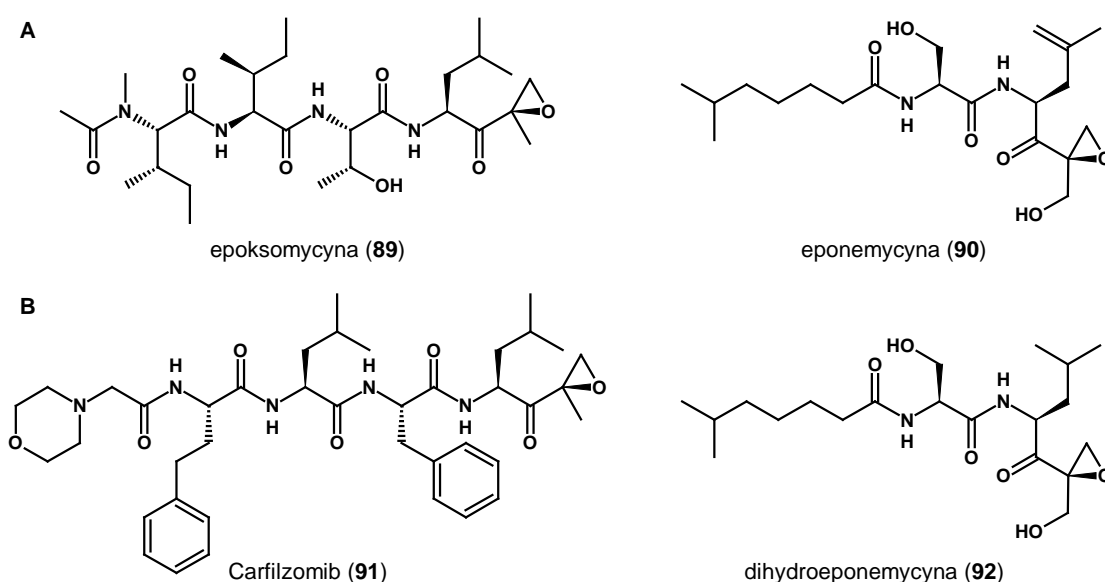


Schemat 27. Synteza dipeptydów z C-kończącą grupą kwasu boronowego.

otrzymanych dipeptydów z grupą kwasu boronowego **88** niezbędna jest obecność L-leucyny w pozycji P1. W pozycji P2 dipeptydu największy wpływ miała obecność dużych grup aromatycznych takich jak występująca w związku **82** grupa 1-naftylometylowa (Schemat 27, R = 1-Nal, R₁ = 4-Morph). Wprowadzenie tego typu grup jako łańcuchów bocznych aminokwasów wymaga jednak wieloetapowej syntezy substratów typu **84**.¹⁰⁶

3.5.1.3. Epoksyketony

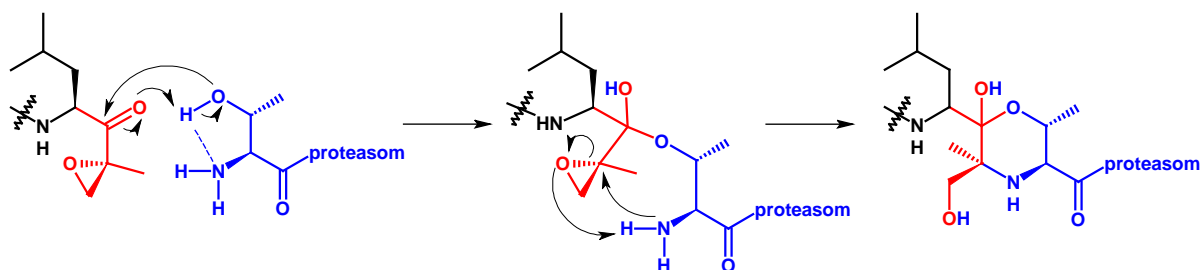
Do przedstawicieli α',β' -epoksyketonów należą zarówno związki pochodzenia naturalnego epksomycyna (**89**) oraz eponemycyna (**90**) jak również syntetyczne Carfilzomib (**91**) oraz dihydroeponemycyna (**92**) (Rysunek 8). Epksomycyna, wydzielona ze szczepu



Rysunek 8. Przykłady inhibitorów proteasomów z grupą epoksyketonową; A – pochodzenia naturalnego, B - syntetyczne.

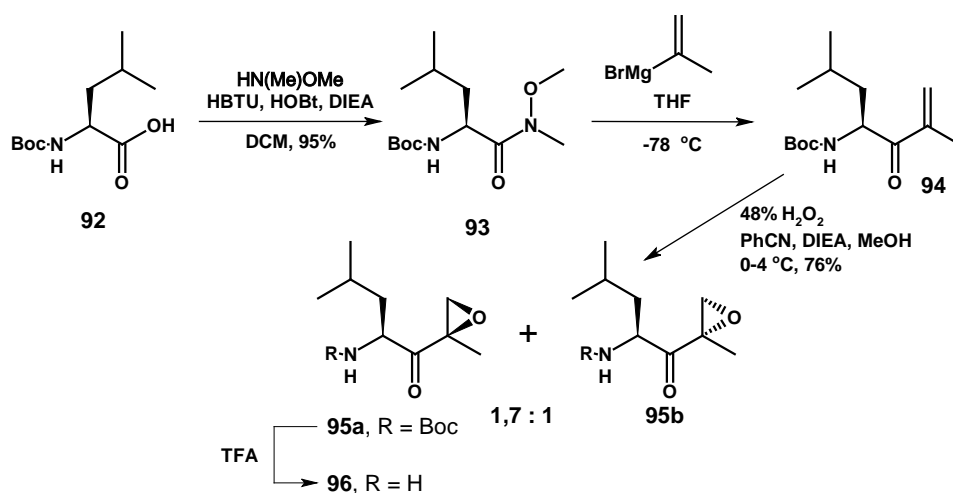
Actinomycetes, hamuje aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu,¹⁰⁷ z kolei eponemycyna i jej syntetyczna pochodna dihydroeponemycyna hamują zarówno aktywność chymotrypsynopodobną jak i kaspazopodobną.¹⁰⁸ Epoksyketony stanowią grupę inhibitorów proteasomów o największej specyficzności co wynika z mechanizmu tworzenia adduktów inhibitor – proteasom. Inhibitory te jako jedyne tworzą nieodwracalne wiązanie z obydwoma grupami funkcyjnymi występującymi w reszcie Thr1 aktywnych podjednostek proteasomu. Zarówno grupa hydroksylowa jak i aminowa w wyniku reakcji z ugrupowaniem epoksyketonowym inhibitora tworzy sześciocząłowy pierścień morfolinowy (Schemat 28).^{60,65} Selektowność ta wynika z faktu, że inne proteazy jak serynowe i cysteinowe nie posiadają wolnej grupy aminowej sąsiadującej z nukleofilową grupą

katalityczną (hydroksylową), co uniemożliwia tworzenie pierścienia morfolinowego.¹⁰⁹ Carfilzomib jest jedynym inhibitorem tej klasy wprowadzonym do etapu badań klinicznych i wykazuje wysoką aktywność porównywalną do aktywności bortezomibu ale znacznie wyższą selektywność.¹¹⁰



Schemat 28. Mechanizm inhibicji proteasomu przez inhibitor z grupą epoksyketonową.

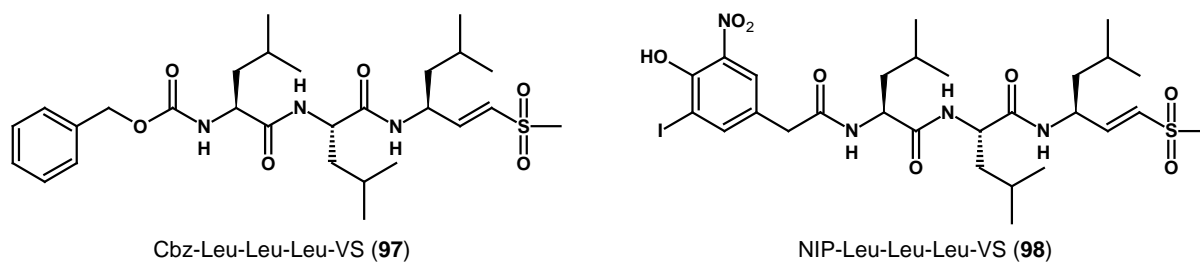
Peptydy z C-kończącą grupą α',β' -epoksyketonową otrzymuje się między innymi na drodze sprzęgania α',β' -epoksyketonowej pochodnej leucyny **96** z grupą karboksylową wcześniej przygotowanego łańcucha peptydowego. Pochodną **96** otrzymuje się z *N*-Boc-leucyny. W pierwszym etapie zabezpieczony aminokwas sprzęga się z *N,O*-dimetylohydroksyloaminą otrzymując amid Weinreba **93**, który poddaje się reakcji z bromkiem 2-propenylomagnezowym. Tak otrzymany α',β' -nienasycony keton **94** w reakcji epoksydowania nadtlenkiem wodoru przeprowadzono w mieszaninę α',β' -epoksyketonów **95a** i **95b** o proporcji 1,7 : 1 (Schemat 29).¹¹¹ 2-(*R*)-Epoksyd **95a** odbezpieczono w reakcji z TFA i przeprowadzono w epksomycynę **89** poprzez sprzęganie z tripeptydem Ac-Melle-Ile-Thr-OH. Epoksydowanie można także przeprowadzić na tetrapeptydzie z C-kończącą grupą winyloketonową.¹¹¹ Jednakże w tej metodzie problemem jest osiągnięcie odpowiedniej selektywności w reakcji epoksydowania, ponieważ produkt w postaci 2-(*S*)-epoksydu jest produktem ubocznym co powoduje znaczne obniżenie wydajności reakcji.



Schemat 29. Synteza α',β' -epoksyleucyny **96** jako substratu w syntezie epksomycyny.

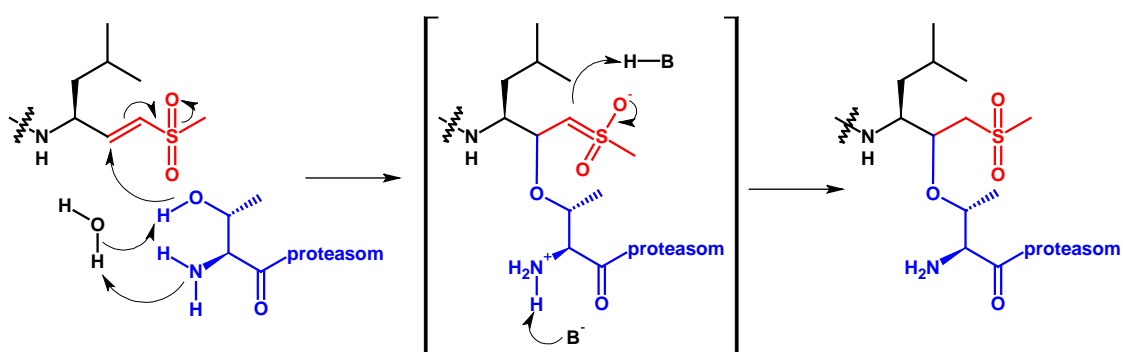
3.5.1.4. Winylosulfony

Kolejną obszerną grupą inhibitorów proteasomów są peptydy z C-końcową grupą winylosulfonową. Są to syntetyczne inhibitory nieodwracalnie i kowalencyjnie wiążące się z proteasomem, blokujące strukturę jego podjednostek β . Po raz pierwszy opisane zostały przez grupę Bogyo w 1997 roku.¹¹² Przykładem tej grupy inhibitorów są tripeptydy Cbz-Leu-Leu-Leu-VS (**97**) oraz NIP-Leu-Leu-Leu-VS (NLVS, **98**) (Rysunek 9). Inhibitory



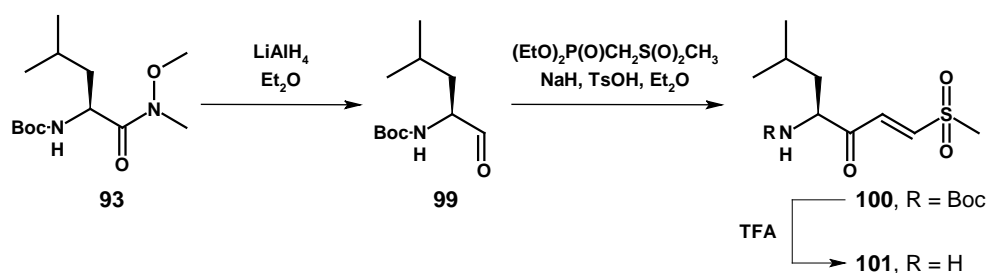
Rysunek 9. Przykłady inhibitorów proteasomów z grupą winylosulfonową.

te, zbudowane na bazie inhibitora MG-132, charakteryzują się równie wysoką aktywnością jednakże nieco niższą selektywnością ze względu na zdolność inhibicji proteinaz cysteinowych jak katepsyna B i S.¹¹² Mechanizm działania winylosulfonów jako inhibitorów proteasomów polega na nieodwracalnym utworzeniu kowalencyjnego wiązania z resztą hydroksylową grupy Thr1 proteasomu w reakcji Michaela (Schemat 30).⁶⁷ Tripeptyd **86** po wymianie atomu jodu na izotop [¹²⁵I] może być również stosowany jako próbnik w badaniach radioznakowania centrów aktywnych podjednostek β proteasomu w różnych tkankach i komórkach organizmu.¹¹²



Podobnie jak w przypadku syntezy α',β' -epoksyketonów winylosulfony otrzymuje się w reakcji sprzęgania pochodnej winylosulfonowej odpowiedniego aminokwasu z *N*-funkcjonalizowanym dipeptydem. Grupę winylosulfonową wprowadza się do struktury aminokwasu zgodnie ze Schematem 31. W pierwszym etapie *N*-zabezpieczony aminokwas

przeprowadza się w pochodną amidu Weinreba **93** analogicznie do metody przedstawionej na Schemacie 29. Następnie w reakcji redukcji amidu Weinreba wodorkiem litowoglinowym otrzymano aldehyd **99**, który poddano reakcji Wittiga z otrzymaniem ugrupowania winylosulfonowego w produkcie **100**. W ostatnim etapie odbezpieczono grupę aminową, która następnie sprzęgana była z grupą karboksylową odpowiedniego dipeptydu.¹¹² Po odpowiedniej prostej funkcjonalizacji produktów sprzęgania otrzymano inhibitory proteasomów w tym również związki **97** i **98** (Schemat 31). Alternatywą do tej syntezy jest synteza na stałym nośniku, którą otrzymano związek **97**, ale wykorzystano ją również do syntezy α',β' -epoksyketonów.¹¹³

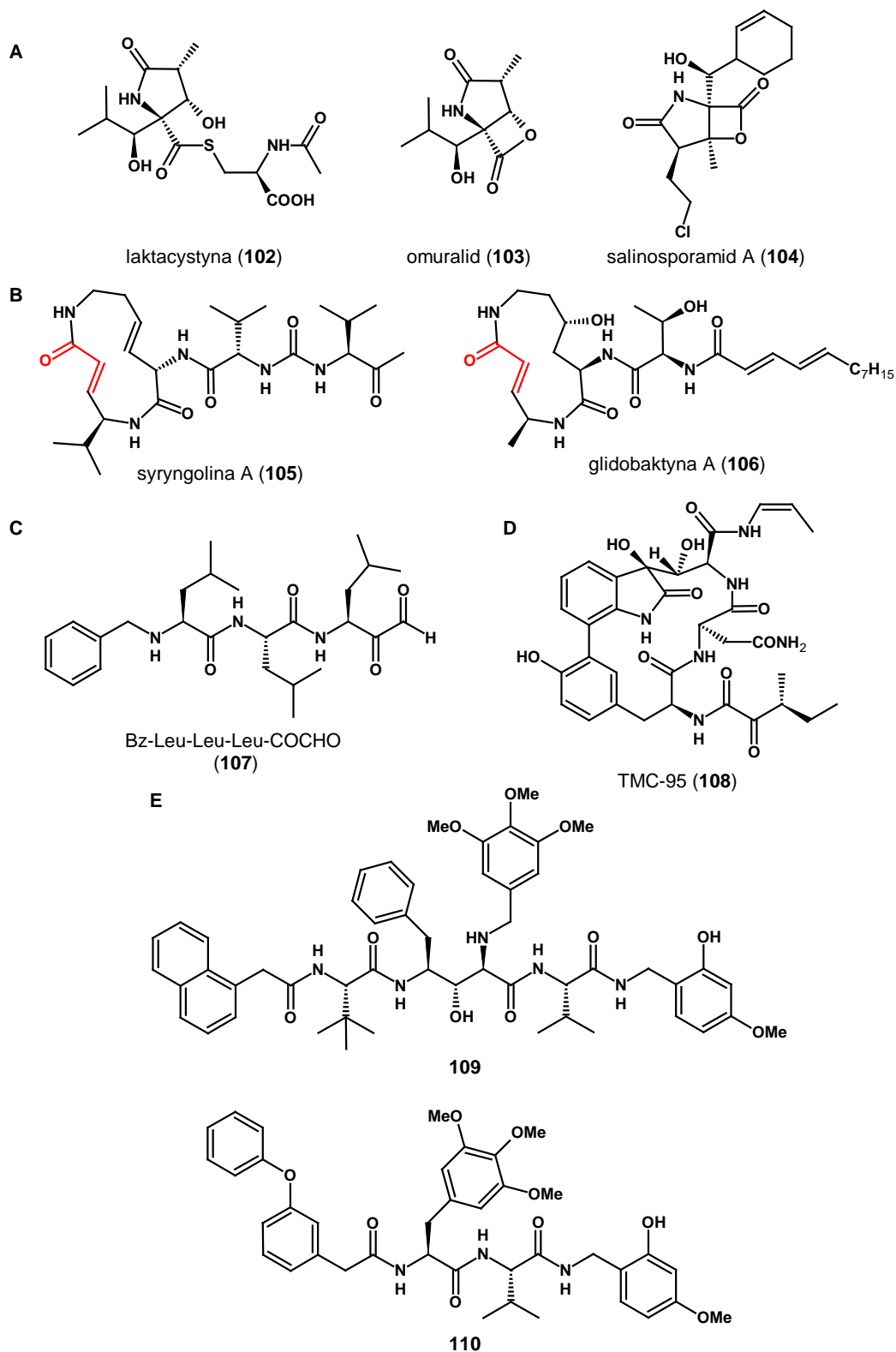


Schemat 31. Synteza winylosulfonowej pochodnej leucyny **101** jako prekursora w syntezie inhibitorów proteasomów z C-kończącą grupą winylosulfonową..

3.5.1.5. Inne grupy inhibitorów proteasomów

Do pozostałych, mniej licznych grup syntetycznych i naturalnych inhibitorów proteasomów należą β -laktony **A**, makrocycliczne winyloketony **B**, ketoaldehydy **C**, cykliczne peptydy **D** oraz niekowalencyjne inhibitory proteasomów **E** (Rysunek 10).

Do przedstawicieli **β -laktonów** należą związki pochodzenia naturalnego jak laktacystyna (**102**) wydzielona ze szczepu *Streptomyces lactacystinaeus* oraz salinosporamid A (NPI-0052, **104**) ze szczepu morskiego promieniowca *Salinispora tropica*. Laktacystyna selektywnie i nieodwracalnie modyfikuje podjednostkę β_5 proteasomu, blokując jego aktywność. Blokuje również aktywność pozostałych katalitycznie aktywnych podjednostek β proteasomu, jednakże w sposób odwracalny i z mniejszym potencjałem. Dalsze badania wykazały, że laktacystyna bezpośrednio nie blokuje proteasomu *in vitro* a aktywność uzyskuje w pH = 8 w wyniku przekształcenia w clasto-laktacystyno- β -lakton – omuralid (**103**). Dotychczas podjęto wiele prób syntezy totalnej laktacystyny, omuralidu oraz ich pochodnych. Problemem tym zajmowali się między innymi Corey¹¹⁴⁻¹¹⁶ oraz Kobayashi.¹¹⁷ Jednakże, wadą tych metod jest ich wieloetapowość i pracochłonność.



Rysunek 10. Przykłady inhibitorów proteasomów; A – β -laktony; B – winyloketony; C – ketoaldehyd; D – cykliczny peptyd; E – inhibitory niekowalencyjne.

Grupę **makrocyklicznych winyloketonów** reprezentują naturalnego pochodzenia syringolina A (SylA, **105**) oraz glidobaktyna A (Glb, **106**), które blokują proliferację komórek nowotworów złośliwych oraz indukują apoptozę wynikającą ze specyficznej

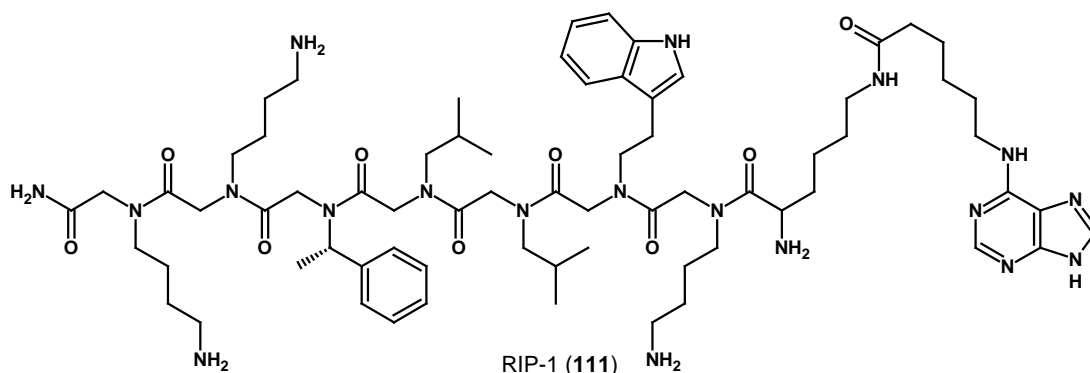
inhibicji proteasomu. Hamują głównie aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu bez wyraźnego wpływu na inne proteazy.¹¹⁸ Synteza pochodnych syryngoliny została opracowana dopiero w 2009 r.¹¹⁹

Ketoaldehydy są analogami aldehydów peptydowych o łańcuchach składających się na ogół z 3-4 aminokwasów. Jednym z przykładów tego typu inhibitorów jest Bz-Leu-Leu-Leu-COCHO (**107**). Oddziałuje on ze wszystkimi podjednostkami β proteasomu, przy czym hamuje aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu z podobną intensywnością ($K_i = 3.7$ nM) do MG-132.⁹⁸ Jednakże w przypadku apoptozy komórek szpiczaka mnogiego znacznie ustępuje skutecznością zarówno MG-132 jak i bortezomibowi.⁹⁹ Ketoaldehydy otrzymuje się z *N*-zabezpieczonych peptydów z wolną C-końcową grupą karboksylową, które przez etap mieszanego bezwodnika przeprowadzono w pochodne diazoketonowe. Następnie w reakcji utleniatywnego usunięcia grupy diazowej z zastosowaniem dimetylodioksyranu (Me_2CO_2) otrzymano docelowe ketoaldehydy w tym także **107**.⁹⁸

Kolejną ważną grupą są **cykliczne peptydy** z głównym przedstawicielem TMC-95 (**108**). Jest on naturalnym inhibitorem, wydzielonym z *Apiospora montagnei*, który oddziałuje ze wszystkimi aktywnymi podjednostkami β proteasomu w sposób odwracalny i niekowalencyjny w związku z czym nie blokuje on bezpośrednio grupy hydroksylowej w reszcie Thr1 ($\text{IC}_{50} = 5,4$ nM, $K_i = 1,1$ nM).¹²⁰ Ten posiadający heterocykliczne ugrupowanie indolinonu inhibitor oddziałuje z centrum aktywnym proteasomu poprzez układ licznych wiązań wodorowych.¹²¹

Ostatnią istotną grupą inhibitorów proteasomów są pochodne 2-aminobenzylostatyny, które niekowalencyjnie oraz selektywnie hamują chymotrypsynopodobną aktywność proteasomu, czyli tak zwane **inhibitory niekowalencyjne**. Związki tego typu były wstępnie badane pod kątem inhibicji proteazy HIV jednak w 2001 roku została potwierdzona ich aktywność względem proteasomu.¹²² Inhibicja proteasomu polega na blokowaniu dostępu do centrum aktywnego poprzez jego oddziaływanie z inhibitorem przez szereg wiązań wodorowych oraz oddziaływań hydrofobowych z licznymi, obszernymi i rozbudowanymi grupami aromatycznymi i alifatycznymi w cząsteczce inhibitora. Do najbardziej aktywnych w tej grupie należą związki **109** ($\text{IC}_{50} = 7,0$ nM) i **110** ($\text{IC}_{50} = 15,0$ nM).¹²²⁻¹²⁵ Do osiągnięcia znacznej aktywności przez te związki wymagana jest obecność C-końcowej grupy fenolowej wypełniającej wnękę S1 centrum aktywnego proteasomu oraz reszty 2-amino-(3,4,5)-trimetoksybenzylowej, która wypełnia wnękę S3. Podstawienie atomu tlenu w grupie fenolowej oraz zamiana grupy trimetoksybenzylowej na mniejszą lub zmiana położenia podstawników metoksylowych w pierścieniu prowadzi do spadku aktywności.¹²⁵

W odróżnieniu do wszystkich opisanych do tej pory inhibitorów, które hamują aktywność proteolityczną proteasomu 20S, istnieje nieliczna grupa związków posiadających zdolność blokowania aktywności regulatorowej części proteasomu 19S. Są to związki o strukturze peptoidów – *N*-podstawionych oligoglicyn. Przebadano bibliotekę 32 768 związków o tej strukturze i w przypadku tylko jednego z nich wykazano zdolność hamowania aktywności proteasomu 19S. Aktywność ta polega na inhibicji procesu rozwijania łańcuchów peptydowych przez regulatorową część proteasomu. Związkiem tym jest RIP-1 (*regulatory particle inhibitor peptoid-1*) (**111**) (Rysunek 11).^{126,127} Posiada on reszty aminokwasowe



Rysunek 11. Inhibitor blokujący aktywność części regulatorowej proteasomu 19S – RIP1.

lizyny, leucyny oraz nienaturalnych homotryptofanu i β -metylofenyloalaniny przesunięte z atomów węgla α aminokwasów na sąsiadujące z nimi atomy azotu a także grupę purynową połączoną ze szkieletem peptydowym łącznikiem alkiloamidowym. Aktywność RIP-1 powoduje w komórkach nowotworowych HeLa indukcję akumulacji białka p27 co pociąga za sobą inhibicję aktywności proteolitycznej układu ubikwityna – proteasom. Aktywność RIP-1 nie jest jednak wysoka. Do osiągnięcia aktywności porównywalnej do aktywności MG-132 należy stosować 100-krotnie większe stężenie RIP-1.¹²⁶ Jest to jednak ciekawy, nowy kierunek badań mechanizmu hamowania i działania proteasomu.

3.5.1.6. Podsumowanie przeglądu inhibitorów proteasomów

Należy zwrócić uwagę na zasadnicze podobieństwa i różnice w strukturze opisanych inhibitorów proteasomów. Otóż porównując wyniki badań inhibicji tych związków można stwierdzić, że do osiągnięcia znacznej aktywności inhibitory powinny mieć strukturę małych peptydów zbudowanych z 2-4 aminokwasów. Resztę w pozycji P1 peptydu powinien stanowić rozgałęziony łańcuch alifatyczny i w przeważającej ilości przypadków jest to grupa izobutylova (reszta leucynowa), np.: MG-132 (**76**), bortezomib (**80**), Carfilzomib (**83**). W pozycjach P2 i P3 peptydu powinny znajdować się obszerne grupy, na ogół aromatyczne, jak

fenylowa czy naftylowa, zdolne do oddziaływania hydrofobowego z wnękami S2 i S3 centrum aktywnego proteasomu (MG-167 (77), MG-273 (79), bortezomib (80)). Najistotniejsze różnice w aktywności oraz selektywności inhibitorów obserwuje się w przypadku porównania związków z różnymi grupami funkcyjnymi na C-końcu łańcucha peptydowego. Związki posiadające najwyższą aktywność posiadają w tej pozycji grupę aldehydową (MG-167, 77). Są one jednocześnie najszerzej poznane i w dalszym ciągu badane pod kątem ich nowego zastosowania. Wadą tej grupy jest jednak niska selektywność i względnie wysoka niepożądana reaktywność. Najskuteczniejszą grupą inhibitorów proteasomów okazały się kwasy boronowe ze stosowanym w kuracji szpiczaka mnogiego bortezomibem (80). Jego zaletami są mała masa cząsteczkowa, dobra biodostępność oraz wysoka selektywność. Pozostałe inhibitory o strukturze peptydów okazały się niezwykle selektywne ze względu na specyficzne oddziaływanie z proteasomem. Pomimo niższej aktywności niejednokrotnie zostały dopuszczone do zaawansowanych faz badań klinicznych. Jeśli chodzi o sposób działania, odmienną grupą inhibitorów proteasomów są związki niekowalencyjnie blokujące centrum aktywne enzymu (TMC-95 (108), oraz 109 i 110). W tym wypadku nie następuje modyfikacja miejsca katalitycznego proteasomu czyli reszty Thr1 tylko blokowanie dostępu substratu do centrum aktywnego poprzez wbudowanie się w nie cząsteczki inhibitora z udziałem oddziaływań hydrofobowych i wiązań wodorowych. Nowym kierunkiem w badaniach inhibicji proteasomu jest stosowanie do tego procesu peptoidów o strukturze *N*-podstawionych glicyn.

Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż jakkolwiek w strukturze inhibitorów proteasomów niekiedy obecne są łańcuchy boczne aminokwasów niekodowanych (nie wchodzących w skład 20 podstawowych L-aminokwasów tworzących białka) z takimi resztami jak naftyloalanina (MG-167), homofenyloalanina (Carfilzomib) lub też proste, symetryczne α,α -dipodstawione aminokwasy,⁸¹ to niemalże nieobecne są aminokwasy o nienaturalnej konfiguracji D. Wynika to przede wszystkim z trudności napotykanym w syntezie nienaturalnych aminokwasów, a co za tym idzie bardzo wąskim komercyjnym dostępem do tego typu prekursorów peptydów oraz ich wysoka cena jednostkowa. Potwierdza to również fakt, że nie istnieje żaden komercyjnie dostępny funkcjonalizowany dipeptyd o strukturze X-Aa-Aa-OH (X = Cbz, Boc, Fmoc; Aa = aminokwas), który posiadałby w swej strukturze aminokwasy o nienaturalnej konfiguracji. W dostępnej literaturze znanych jest tylko kilka struktur inhibitorów proteasomów z D-aminokwasem w strukturze i jest to jeden ze stereoizomerów MG-132, a mianowicie epimer Cbz-D-Leu-L-Leu-L-Leu-al (MG-192) oraz jego pochodna β -hydroksyaminowa MG-217.⁸¹ Aktywność tych inhibitorów jest jednak

nieporównywalnie niższa od aktywności MG-132 i wynosi odpowiednio K_i MG-192 = 96 nM i K_i MG-217 = 57 nM. Z braku tego typu inhibitorów wynika równolegle brak możliwości sprawdzenia ich biologicznych właściwości. Niekiedy zmiana konfiguracji na α węgla aminokwasu w inhibitorze może dawać w efekcie związki o równie wysokiej aktywności.¹²⁸

4. Synteza tripeptydów

4.1. Metody klasycznej syntezy tripeptydów

Klasyczna synteza szkieletu tripeptydowego ogranicza się do zastosowania reakcji sprzęgania (kondensacji) odpowiednio zabezpieczonych aminokwasów. Do tego celu stosuje się różne czynniki sprzęgające z dodatkami aktywującymi grupy funkcyjne oraz zapobiegającymi racemizacji. W przypadku wprowadzania do struktury tripeptydów nienaturalnych aminokwasów dokonuje się również syntezy tych prekursorów poprzez odpowiednie modyfikacje łańcuchów bocznych. Ostatnim etapem syntezy jest na ogół odpowiednia funkcjonalizacja (np. odbezpieczenie, hydroliza, utlenienie) grup funkcyjnych występujących na C- i N-końcach tripeptydu oraz w łańcuchach bocznych tworzących go aminokwasów. Niekiedy dokonuje się także modyfikacji jednego lub kilku wiązań peptydowych poprzez alkilowanie atomu azotu tej grupy. Wszelkie tego typu modyfikacje, tj. obecność grup funkcyjnych na C- i N-końcach oraz na wiązaniach peptydowych a także zastąpienie wiązań peptydowych np. estrowym (w depsipeptydach) lub β -hydroksyaminowym prowadzą do utworzenia struktur zwanych peptydomimetykami. Peptydomimetyki są to związki, zawierające niepeptydowe elementy strukturalne, które zdolne są do naśladowania lub antagonizowania działania biologicznie naturalnego peptydu.⁷³

Rozróżnia się także dwie zasadnicze techniki syntezy peptydów, a mianowicie w roztworze oraz na fazie stałej (na stałym nośniku). W przypadku syntezy w roztworze stosuje się standardowe metody postępowania z próbką. Natomiast w przypadku syntezy tripeptydu na stałej fazie jedna z grup funkcyjnych jednego substratu (aminokwasu) połączona jest bezpośrednio lub za pomocą łącznika z nierozpuszczalnym polimerowym nośnikiem. W dalszych etapach dobudowywane są kolejne aminokwasy, a w ostatnim następuje usunięcie nośnika i wydzielenie wolnego tripeptydu. Metoda ta po raz pierwszy została zastosowana przez Merrifielda¹²⁹ i obecnie jest szeroko stosowana w przemysłowej syntezie peptydów przy użyciu automatycznych syntezyatorów.

4.1.1. α -Aminoaldehydy oraz tripeptydy z grupą aldehydową

Związki z grupą aldehydową, takie jak α -aminoaldehydy (pochodne α -aminokwasów) oraz małe peptydy w tym tripeptydy (np. MG-132), odgrywają ogromną rolę w syntezie organicznej z racji ich szerokiego zastosowania wynikającego z reaktywności grupy

aldehydowej. W syntezie związków biologicznie czynnych w tym także inhibitorów proteasomów funkcjonalizacja grupy aldehydowej jest dobrym narzędziem tworzenia nowych grup związków.^{130,131} Otrzymywanie aldehydów posiadających centrum stereogeniczne w pozycji α wymaga szczególnego doboru odpowiednich reagentów i warunków reakcji, których stosowanie nie niesie ryzyka epimeryzacji lub znacznie je ogranicza.

Dotychczas opracowano wiele metod syntezy aldehydów peptydowych oraz α -aminoaldehydów. Do syntezy aldehydów stosuje się między innymi metody:

a) selektywnego utleniania grupy alkoholowej:

- silnymi reagentami utleniającymi np. reagent Collinsa ($\text{CrO}_3 \times \text{Py}$, dichlorometan), dwuchromian pirydyny (PDC), chloromrówczan pirydyny (PCC),

- w warunkach różnych wariantów z zastosowaniem dimetylosulfotlenku, np. metodą Parikh-Doeringa ($\text{DMSO}/\text{SO}_3 \times \text{Py}$), metodą Swerna (DMSO, chlorek oksalilu), metodą Pfitznera i Moffata (DMSO, DCC, H_3PO_4),

- 2,2,6,6-tetrametylopiperidyno-1-oxylem (TEMPO) i jego pochodnymi,

- hiperwaleńnymi reagentami jodowymi, np. kwasem 2-jodobenzoesowym kwasem jodoksybenzoesowym (IBX), reagentem Dess-Martina,

- metodami enzymatycznymi z zastosowaniem dehydrogenaz;

b) selektywnej redukcji kwasów karboksylowych, estrów oraz amidów różnymi wariantami wodorków litowo-glinowych; najczęściej w tej grupie reakcji stosuje się wodorek diizobutyloglinowy (DIBAL-H) do redukcji estrów kwasów karboksylowych;

c) redukcji ugrupowania amidu Weinreba ($\text{R-CON}(\text{Me})\text{OMe}$) lub jego pochodnych wodorkiem litowo-glinowym (LAH);

d) ozonolizy grupy winylowej.

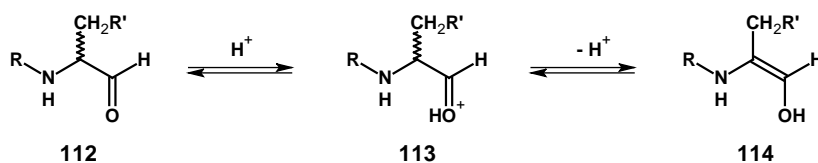
Przy doborze warunków reakcji należy jednak pamiętać o ryzyku racemizacji (epimeryzacji) na centrum stereogenicznym aminoaldehydu (peptydu).

Istnieje wiele doniesień na temat badań nad syntezą α -aminoaldehydów,¹³² których prekursorzy stosuje się również jako bloki budulcowe w syntezie aldehydów peptydowych. W badaniach tych niejednokrotnie poruszano problem racemizacji na centrum stereogenicznym sąsiadującym z grupą aldehydową. Dotychczas zostało opracowanych wiele metod syntezy tego typu związków w warunkach, w których epimeryzacja była wyeliminowana lub zmniejszona do minimum. Z większym problemem spotykano się w przypadku prób oczyszczania i wydzielania czystych produktów. Metody oczyszczania opisane w literaturze powodują bowiem znaczną epimeryzację tych związków, dlatego też, gdy aldehydy używane

są do dalszych przemian na ogół stosuje się jedynie ich proste oczyszczenie w postaci ekstrakcji.

4.1.1.1. α -Aminoaldehydy

W prowadzonych przez zespół Ito badaniach nad syntezą α -aminoaldehdów w reakcji redukcji α -aminoestrów z zastosowaniem DIBAL-H wykazano, że warunki reakcji powodują racemizację produktu w minimalnym stopniu. Dopiero w warunkach chromatograficznego oczyszczania produktów obserwowano znaczną lub wręcz pełną racemizację.¹³³ Inne metody oczyszczania α -aminoaldehdów okazały się w tym przypadku nieskuteczne. Przeprowadzono także próby oczyszczania aldehdów poprzez przeprowadzenie ich w postać semikarbazonu w reakcji z semikarbazidem bezpośrednio dodanego do mieszaniny reakcyjnej. W tym wypadku racemizacja była praktycznie zatrzymana i jedynie w przypadku pochodnej cysteiny obserwowano nieznaczną racemizację rzędu 5%. Autorzy zaproponowali prawdopodobny mechanizm racemizacji aldehdów **112** przez keto-enolową tautomeryzację, która niemożliwa jest w przypadku semikarbazonów co wyjaśniałoby ich większą stabilność (Schemat 32).

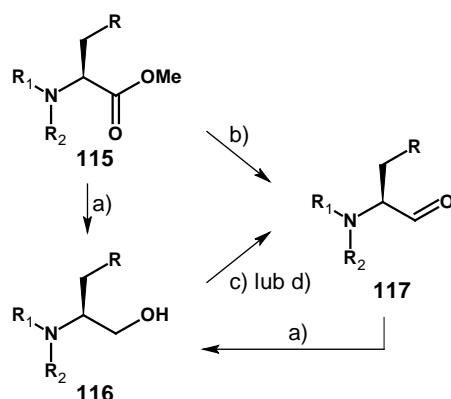


Schemat 32. Mechanizm racemizacji przez tautomeryzację keto-enolową katalizowaną na kwaśno.

Podobne badania przeprowadzono na Boc-L-leucynalu, który otrzymano poprzez wydajną redukcję Boc-L-leucyny w układzie BH_3/THF do alkoholu i jego selektywne utlenienie do aldehdy metodą Collinsa (CrO_3 /pirydyna). Czystość optyczną produktu bezpośrednio po otrzymaniu oraz po okresie 1 i 9 dni przechowywania określono poprzez przeprowadzenie go w *N*-dansyloleucynę (dansyl = 5-(dimetyloamino)naftaleno-1-sulfonyl)) w następujących etapach: redukcja do alkoholu ($NaBH_4$), utlenienie do Boc-leucyny ($KMnO_4$), usunięcie grupy zabezpieczającej (HCl), reakcję z chlorkiem dansylu. Analizę przeprowadzono z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz skręcalności właściwej. Wykazano, że przechowywanie aldehdy w temperaturze $-30\text{ }^\circ C$ praktycznie nie wpływa na jego czystość enancjomeryczną. Natomiast przechowywanie związku w temperaturze $24\text{ }^\circ C$ powoduje znaczną racemizację.¹³⁴

Grupa Jurczaka otrzymała α -aminoaldehydy **117** na drodze selektywnego utleniania odpowiednich α -aminoalkoholi **116** z zastosowaniem TEMPO oraz metodą Swerna a także

poprzez selektywną redukcję α -aminoestrów **115** z zastosowaniem DIBAL-H. Wykazano, że pod kątem minimalnej racemizacji, do syntezy pochodnych seryny, alaniny oraz



Schemat 33. Synteza α -aminoaldehydów **117**: R = H, *p*-MeOC₆H₄, OTBS, OBOM; R₁ = Cbz, Boc, Ts; R₂ = H, Bn; a) LiBH₄, EtOH-THF, 0 °C lub NaBH₄, MeOH, 0 °C lub LiAlH₄, EtOH, 0 °C; b) DIBAL-H, Et₂O, -78 °C, 1 godz.; c) TEMPO, NaOCl, NaBr, NaHCO₃, H₂O, toluen, EtOAc; d) (COCl)₂, DMSO, CH₂Cl₂.

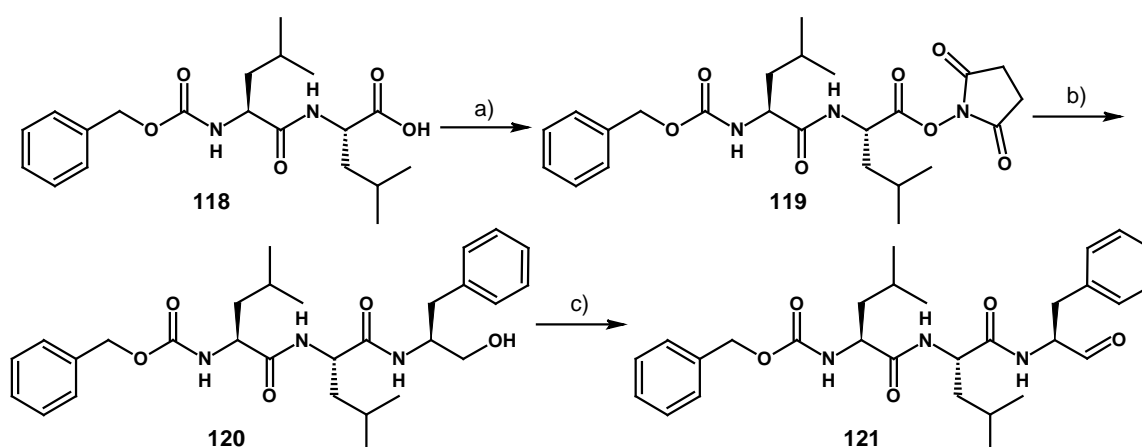
p-metoksyfenyloalaniny najlepszą metodą jest utlenianie alkoholi z zastosowaniem TEMPO. Tą metodą otrzymano produkty o czystości optycznej sięgającej 100% z wydajnościami przekraczającymi 90%. Produkty o niższej czystości optycznej otrzymano w wyniku utleniania metodą Swerna, a zdecydowanie najgorsza okazała się metoda redukcji estrów. Aldehydy **117** nie były jednak oczyszczane, a ich czystość enancjomeryczna była określana metodą skręcalności optycznej lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej po przeprowadzeniu ich w alkohole **116** w reakcji redukcji (Schemat 33).¹³⁵

4.1.1.2. Tripeptydy z C-kończową grupą aldehydową

W analogiczny sposób wprowadza się C-kończową grupę aldehydową w strukturę tripeptydów. Szkielet tripeptydowy buduje się na drodze dwuetapowego sprzęgania aminokwasów, przy czym jeden z nich posiada grupę, której funkcjonalizacja prowadzi do otrzymania grupy aldehydowej i najczęściej jest to amid Weinreba. Grupa inhibitorów proteasomów o strukturze tripeptydowych aldehydów w tym także MG-132 (**76**) była otrzymana według metody przedstawionej na Schemacie 25. Poniżej opisane zostaną pozostałe przykłady ogólnych metodologii syntezy tripeptydów z C-kończową grupą aldehydową.

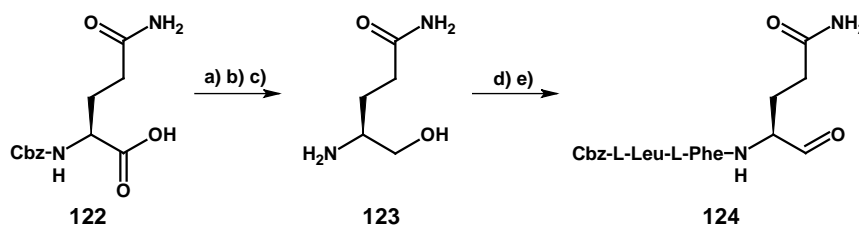
W podobnej do opisanej wcześniej metodzie amid Weinreba wprowadzany jest do *N*-zabezpieczonego aminokwasu po czym ten po odbezpieczeniu sprzęgany jest z dipeptydem Cbz-Leu-Leu-OH i redukowany do aldehydu. Tą drogą został otrzymany między innymi Cbz-Leu-Leu-Phe-al (**121**).¹²⁸ Ten sam związek może być także otrzymany z zastosowaniem

innego prekursora grupy aldehydowej, którą jest grupa hydroksylowa. W tym wypadku szkielet tripeptydu otrzymany został poprzez amidowanie L-feniloalaninolem dipeptydu zabezpieczonego grupą imidu kwasu bursztynowego (Cbz-Leu-Leu-OSu) (**119**). Efektem amidowania jest alkohol **120**, który utleniany jest selektywnie do aldehydu¹³⁶ metodą Pfitznera i Moffata¹³⁷ modyfikowanej i przystosowanej do syntezy aldehydów peptydowych przez Wilka i Orłowskiego.⁵⁴ Reagentami utleniania są dimetylosulfotlenek oraz EDC (zastępujący uciążliwy na etapie oczyszczania dicykloheksylokarbodiimid – DCC) i kwas fosforowy (H₃PO₄) (Schemat 34).¹³⁶



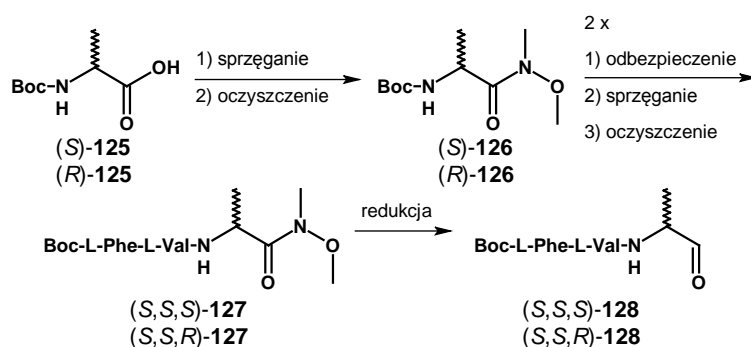
Schemat 34. Synteza tripeptydu aldehydowego Cbz-Leu-Leu-Phe-al. (**109**): a) HOSu; DCC, THF; b) L-Phe-ol, THF; c) DMSO, EDC, H₃PO₄.

Kolejną metodą otrzymywania aldehydów jest utlenianie alkoholi kwasem *o*-jodoksybenzoesowym. Jest to metoda selektywna i równie często stosowana do syntezy aldehydów. Przykładem zastosowania tej metody jest synteza tripeptydu Cbz-Leu-Phe-Gln-al (**124**) z alkoholu tripeptydowego otrzymanego w reakcji sprzęgania α -aminoalkoholu **123** (glutaminolu) z *N*-zabezpieczonym dipeptydem (Schemat 35).¹³¹ Innym reagentem utleniającym działającym w podobny sposób jest reagent Dess-Martina, który otrzymuje się przez perjodowanie IBX.



Schemat 35. Synteza tripeptydu aldehydowego Cbz-Leu-Phe-Gln-al: a) AcCl, MeOH; b) NaBH₄, LiCl, THF, EtOH; c) 10% Pd/C, H₂, MeOH; d) Cbz-Leu-Phe, *N*-hydroksymid kwasu bursztynowego, DCC, CH₂Cl₂, DMF; e) IBX, DMSO.

Podobnie jak w przypadku α -aminoaldehydów, jednakże w bardziej systematycznych badaniach sprawdzono wpływ warunków różnych chromatograficznych metod oczyszczania aldehydów peptydowych na ich epimeryzację. Aldehydy (*S,S,S*)-**128** i (*S,S,R*)-**128** otrzymano na drodze reakcji klasycznego sprzęgania (Schemat 36). Obydwa enancjomery alaniny z prekursorem grupy aldehydowej w postaci amidu Weinreba (*S*)-**126** i (*R*)-**126** w sekwencji reakcji poddano reakcjom sprzęgania kolejno z enancjomerami (*S*) waliny i fenyloalaniny. Otrzymano w ten sposób dwa epimery tripeptydu z grupą amidu Weinreba ((*S,S,S*)-**127** i (*S,S,R*)-**127**). Redukcja amidów Weinreba doprowadziła do otrzymania Boc-L-Phe-L-Val-L-Ala-al ((*S,S,S*)-**128**) oraz Boc-L-Phe-L-Val-D-Ala-al ((*S,S,R*)-**128**). Następnie w warunkach chromatografii cieczowej: roztwór w mieszaninie heksan:EtOAc z



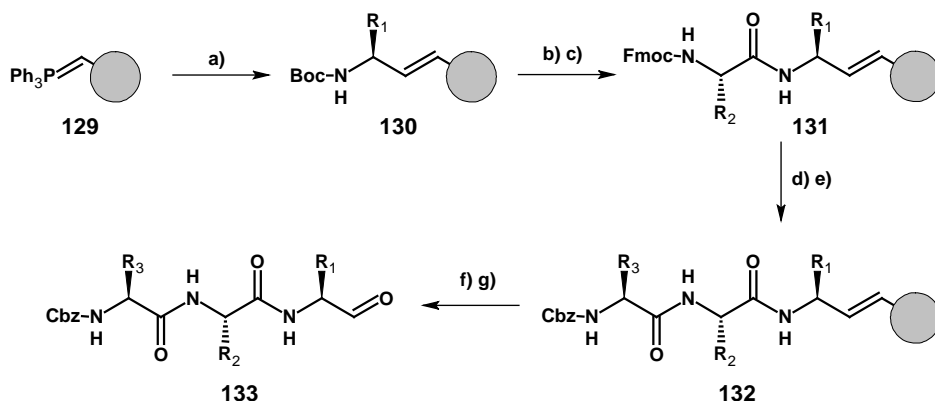
Schemat 36. Synteza epimerów tripeptydu Boc-L-Phe-L-Val-L,D-Ala-al ((*S,S,S*)-**128** + (*S,S,R*)-**128**).

dotądkiem żelu krzemionkowego, żelu krzemionkowego z pirydyną lub tlenku glinu zbadano postęp epimeryzacji aldehydów. Spodziewano się, że zastosowanie dwóch ostatnich bardziej zasadowych warunków powinno zapobiegać epimeryzacji katalizowanej kwasem poprzez hamowanie enolizacji grupy formylowej. Wykazano jednak, że wszystkie ze zbadanych warunków powodowały 25-49% epimeryzację. Również przechowywanie aldehydów w postaci roztworów w deuterowanym chloroformie w ciągu jednego tygodnia powodowało znaczną epimeryzację (30 – 32%).¹³⁸

Wszystkie wyżej opisane syntezy aldehydów prowadzone są w roztworze. Jednakże w syntezie peptydów, w tym także aldehydów, często stosuje się wcześniej wspomnianą technikę syntezy na fazie stałej. Szkielet tripeptydowy jest w tym wypadku budowany na polimerowym nośniku, z którym jedna z reszt aminokwasowych połączona jest przy pomocy łącznika olefinowego¹³⁹ lub z grupą amidu Weinreba^{140,141} i jednocześnie stanowi resztę C-końcową (P1) w docelowym tripeptydzie. W kolejnych etapach stosuje się standardowe procedury syntezy peptydów: sprzęganie zabezpieczonych grupą Boc, Cbz lub Fmoc (9-fluorenylometylokarbonylową) aminokwasów oraz odbezpieczanie kolejnych produktów

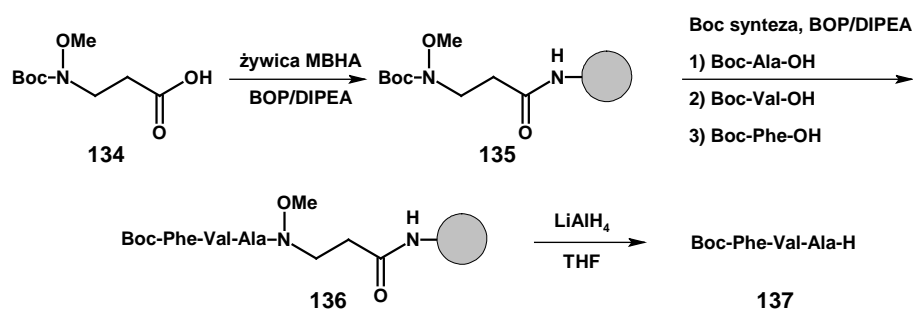
kondensacji. Dużą zaletą tej techniki jest łatwy i szybki przerób reakcji oraz oczyszczanie produktów. Stosuje się w tym wypadku odsączenie i przemywanie związków osadzonych na nośniku. Takie oczyszczenie produktów jest wystarczające do zastosowania ich w kolejnych etapach syntezy.

W przypadku stosowania łącznika olefinowego w pierwszym etapie zabezpieczony α -aminoaldehyd łączony jest z nośnikiem (polistyrenem) w reakcji Wittiga z osadzonym na nim ylidem trifenylfosfoniowym **129**. W efekcie pomiędzy pochodną reszty aminokwasowej oraz nośnikiem utworzone zostaje wiązanie podwójne C=C w związku **130**. Następnie prowadzi się standardową syntezę tripeptydu poprzez dobudowywanie kolejnych reszt aminokwasowych do N-końca tej struktury. W ostatnim etapie następuje usunięcie nośnika w reakcji ozonolizy wiązania podwójnego C=C w **132** z reduktywnym przerobem co prowadzi do uwolnienia tripeptydu z C-końcową grupą aldehydową **133**. Metodą tą w układzie 3×3×3 bloki budulcowe otrzymano bibliotekę 27 aldehydów tripeptydowych **133** o wysokiej czystości i bez obserwowanej racemizacji (Schemat 37).¹³⁹



Schemat 37. Synteza aldehydów tripeptydowych **133** na stałym nośniku z łącznikiem winylowym; a) *N*-Boc-L- α -aminoaldehyd, THF; b) TFA, DCM; c) *N*-Fmoc-L- α -aminokwas, PyBop, DIPEA, DMF; d) piperodyna, DMF; e) *N*-Cbz-L- α -aminokwas, PyBop, DIPEA, DMF; f) O₃, DCM; g) Me₂S, DCM.

Łącznik w postaci amidu Weinreba **134** stosowany był między innymi przez zespół Fehrentza. Był on sprzęgany z żywicą 4-metylobenzhydroaminową (MBHA). Następnie usuwano grupę zabezpieczającą (Boc) i w standardowej procedurze prowadzono syntezę tripeptydów. W ostatnim etapie w reakcji redukcji (LAH) amidu Weinreba **136** otrzymano aldehydy jednocześnie uwalniając produkty z powierzchni żywicy (Schemat 38).¹⁴⁰ Boc-L-Phe-L-Val-L-Ala-al (**137**) badany był pod kątem stabilności konfiguracji na centrum stereogenicznym sąsiadującym z grupą aldehydową w warunkach reakcji oraz oczyszczania. Wykazano, że związek ten jest stabilny w warunkach reakcji redukcji grupy amidu Weinreba i nieoczyszczony produkt występuje jako pojedynczy epimer. Do określenia czystości wykorzystano analizę ¹H NMR odczytując sygnał pochodzący od protonu aldehydowego



Schemat 38. Synteza aldehydu tripeptydowego **137** na stałym nośniku z łącznikiem w postaci amidu Weinreba. (-CHO). W analizie nieoczyszczonego produktu obserwowano pojedynczy sygnał. Natomiast w przypadku produktu oczyszczonego przy pomocy chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie z 0,1% dodatkiem pirydyny oraz przy pomocy wysokosprawnej chromatografii kolumnowej z wypełnieniem o odwróconych fazach (RP HPLC) obserwowano dwa sygnały protonów aldehydowych pochodzące od oczekiwanego produktu i jego epimeru (Boc-L-Phe-L-Val-D-Ala-al), przy czym produkt był bardziej stabilny w warunkach drugiej z metod.¹⁴⁰

Podsumowując, dotychczas zostało opracowanych wiele syntez tripeptydów z C-końcową grupą aldehydową. Jednakże żadna z nich nie rozwiązuje problemu prostego wprowadzenia do struktury produktu aminokwasów z nienaturalną konfiguracją na węglu α . Brak komercyjnego dostępu do *N*-zabezpieczonych dipeptydów o nienaturalnej konfiguracji pociąga za sobą konieczność dodatkowej syntezy tego typu prekursorów co wpływa na szybkość przygotowania poszczególnych produktów.

4.2. Enzymatyczna synteza peptydów

Istnieją również, aczkolwiek mniej liczne, doniesienia na temat chemoenzymatycznej syntezy peptydów. Podejście to polega na zastosowaniu enzymów hydrolitycznych jako katalizatorów reakcji. Metody enzymatyczne syntezy peptydów posiadają wiele zalet w porównaniu do metod klasycznych, a najważniejsze z nich to:

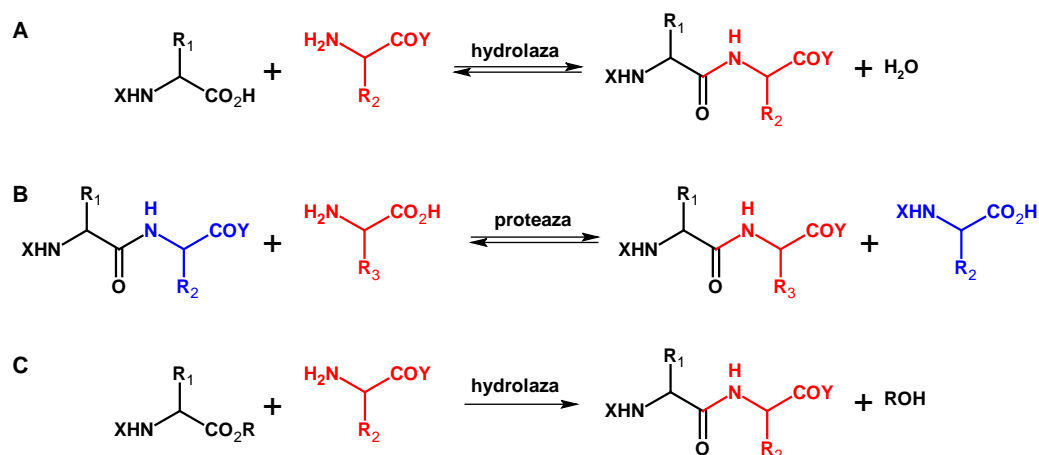
- a) Przebieg reakcji w łagodniejszych warunkach wynikający z obniżenia energii aktywacji poszczególnych etapów reakcji, a także ze specyfikacji prowadzenia reakcji katalizowanych enzymami (układy woda (bufor) / łagodny rozpuszczalnik organiczny), stosowanie szkodliwych odczynników chemicznych jest wyeliminowane;
- b) Wysoka regioselektywność enzymów umożliwiająca stosowanie minimalnie sfunkcjonalizowanych (zabezpieczonych) substratów aminokwasowych

(peptydowych) co wiąże się ze zmniejszeniem ilości etapów syntezy, przyspieszeniem procesu syntezy oraz obniżeniem kosztów pozyskiwania substratów;

- c) Wysoka stereoselektywność enzymów pozwala na przeprowadzenie (dia)stereokontrolowanej syntezy;
- d) Mniejszy wymóg czystości substratów i rozpuszczalników;
- e) Minimalne ilości produktów ubocznych;
- f) Brak ryzyka racemizacji (epimeryzacji) wynikający również ze stosowania łagodnych warunków oraz reagentów.¹⁴²

Wyróżnia się trzy zasadnicze reguły, które mają zastosowanie podczas enzymatycznej syntezy peptydów:

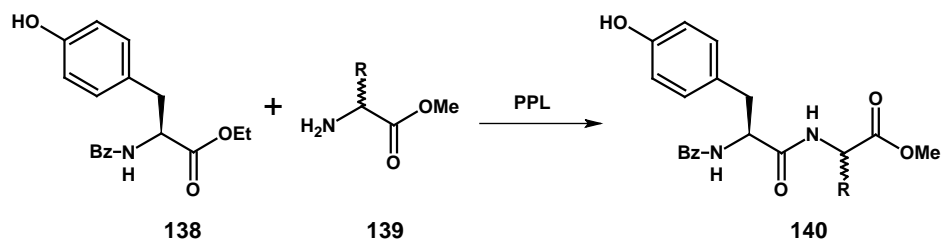
- a) Odwracalna hydroliza (acylowanie) (Schemat 39A);
- b) Transpeptydowanie (Schemat 39B);
- c) Nieodwracalna aminoliza estrów (Schemat 39C).¹⁴²



Schemat 39. Główne reguły enzymatycznej syntezy peptydów: A) odwracalna hydroliza, B) transpeptydowanie, C) aminoliza estrów.

W syntezie enzymatycznej prowadzi się zarówno procesy polegające na stereoselektywnej kondensacji enancjomerycznie czystych pochodnych aminokwasowych jak również procesy diastereoselektywne z zastosowaniem substratów w postaci racemicznych mieszanin. W przypadku drugiej z metod enzym obniża energię aktywacji tworzenia jednego z możliwych produktów faworyzując jego powstawanie. Diastereoselektywna synteza jest niezwykle trudna do osiągnięcia w warunkach klasycznych metod otrzymywania peptydów,

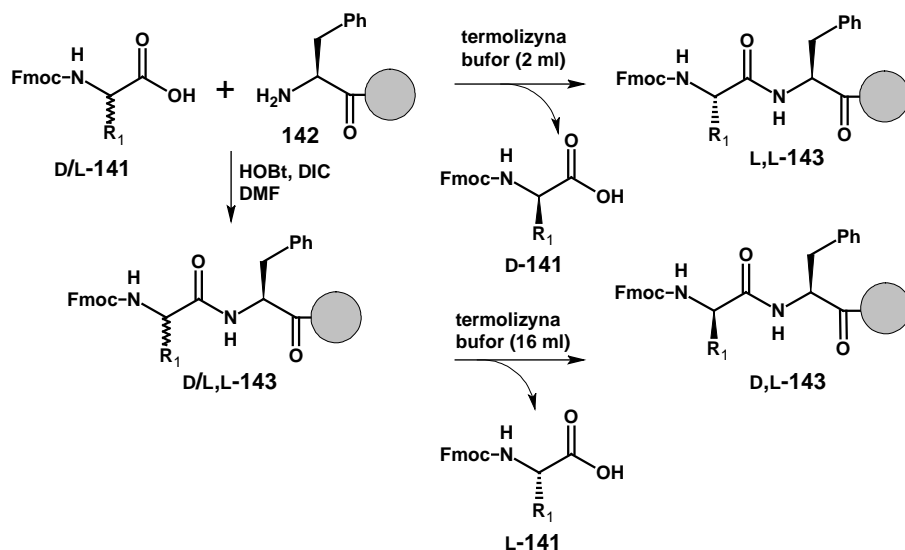
dlatego też synteza enzymatyczna ma ogromne znaczenie w syntezie wielu peptydów, w tym także związków o nienaturalnej konfiguracji na centrach stereogenicznych.



Schemat 40. Synteza dipeptydów **140** w diastereoselektywnej enzymatycznej reakcji aminolizy.

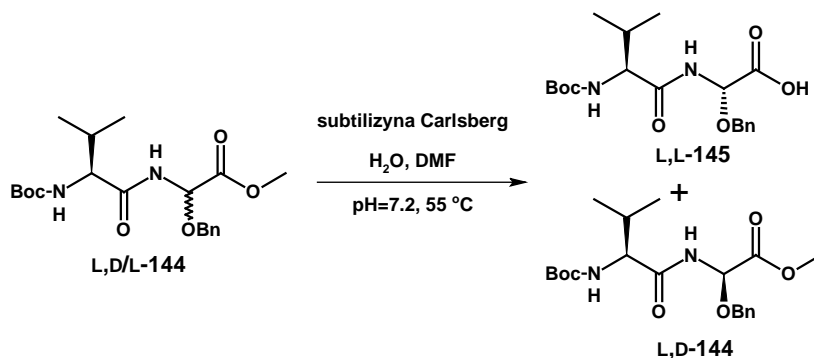
Do enzymatycznej syntezy peptydów **140** zawierających D-aminokwasy stosowano między innymi lipazę z trzustki wieprzowej (PPL, ang. porcine pancreatic lipase). W reakcjach aminolizy estru etylowego *N*-benzylootyrozyny (Bz-L-Tyr-OEt) (**138**) obydwoma enancjomerami estrów metylowych histydyny, seryny oraz treoniny (**139**) otrzymano dipeptydy **140** (Schemat 40). Wykazano, że lipaza ta jest bardziej selektywna wobec form D-aminokwasów i dipeptydy o konfiguracji L,D były otrzymywane z wyższą wydajnością. Największą różnicę w selektywności PPL obserwowano w przypadku syntezy epimerów dipeptydu Bz-L-Tyr-L-His-OMe i Bz-L-Tyr-D-His-OMe. Enzym katalizował bowiem również następczą reakcją uboczną hydrolizy grupy estrowej produktu o konfiguracji L,L. Produkty hydrolizy wydzielono w tej reakcji z wydajnością ilościową. Enzym nie był natomiast aktywny wobec hydrolizy peptydu Bz-L-Tyr-D-His-OMe, który wydzielono z wysoką wydajnością 91%. Korzystając z wyżej wymienionych właściwości PPL można przeprowadzić syntezę enancjomerycznie czystego dipeptydu Bz-L-Tyr-D-His-OMe z zastosowaniem racemicznej mieszaniny H-DL-His-OMe. Metoda ta może służyć zatem do syntezy peptydów o nienaturalnej konfiguracji.¹⁴³

Podobną metodologię zastosowano w syntezie dipeptydów na stałym nośniku katalizowanej przez termolizynę (metaloproteinaza). Badano selektywność tego enzymu w reakcji hydrolizy i acylowania zgodnie ze Schematem 41. W reakcji katalizowanego enzymatycznie acylowania osadzonej na żywicy L-feniloalaniny (**142**) mieszaniną racemiczną *N*-zabezpieczonego aminokwasu (feniloalaniny ($R_1 = \text{CH}_2\text{Ph}$) lub norleucyny ($R_1 = (\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$)) (D/L-**141**) otrzymano produkty o konfiguracji L,L (L,L-**143**). Termolizyna katalizuje tylko reakcję acylowania pomiędzy aminokwasami o naturalnej konfiguracji L-**141** pozostawiając nieprzereagowane D-**141** enancjomery *N*-zabezpieczonych aminokwasów. Produkty kondensacji otrzymano z bardzo wysoką wydajnością (99%) oraz znakomitym nadmiarem diastereoizomerycznym (99%). W reakcji chemicznego sprzężenia otrzymano



Schemat 41. Stereoselektywna synteza dipeptydów **143** na stałym nośniku; $R_1 = \text{CH}_2\text{Ph}$ (Phe), $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ (Nle). mieszaninę epimerów L,L i D,L dipeptydów **143**. W reakcji enzymatycznej hydrolizy mieszanin epimerów D/L,L-**143** ponownie katalizowana jest tylko hydroliza dipeptydu o konfiguracji L,L natomiast na żywicy pozostaje nieprzereagowany epimer D,L-**143**. W efekcie otrzymano Fmoc *N*-zabezpieczone aminokwasy L-**141** z wydajnościami 43-48% (maksymalna teoretyczna wydajność wynosi 50%) i ze znakomitymi nadmiarami enancjomerycznymi (99%).¹⁴⁴

Wśród enzymatycznych metod syntezy peptydów rzadko spotyka się reakcje diastereoselektywnej hydrolizy C-końcowego wiązania estrowego. Istnieje tylko kilka doniesień na temat tego typu reakcji. Jednym z nich jest rozdział kinetyczny mieszaniny L,L i L,D diastereoizomerów dipeptydu Boc-Val-(BnO)Gly-OMe (L,D/L-**144**) przez endopeptydazę serynową subtilizynę Carlsberg, która izolowana jest ze szczepu *Bacillus licheniformis*. Także w tym wypadku enzym katalizował tylko reakcję hydrolizy dipeptydu o naturalnej konfiguracji L,L-**144** do kwasu L,L-**145** pozostawiając nieprzereagowany L,D-**144** diastereoizomer. Obydwa związki wydzielono z prawie ilościowymi wydajnościami,



Schemat 42. Diastereoselektywna enzymatyczna hydroliza grupy estrowej w dipeptydzie **144**.

odpowiednio 96% i 93%, oraz z doskonałym nadmiarem diastereoizomerycznym przekraczającym w obydwu przypadkach 99% (Schemat 42).¹⁴⁵

Ten sam enzym stosowany był do rozdziału kinetycznego czterech par epimerów dipeptydów z C-końcową grupą estrową, metylową lub benzyłową. Analogicznie otrzymano produkty hydrolizy L,L epimerów, jednakże z nieco niższymi wydajnościami (82 - 92%) niż w poprzednim przykładzie. Również czystość optyczna produktów była niższa (87 - 95%). Badania kinetyki reakcji wykazały, że szybkość reakcji hydrolizy epimerów L,L była 30-krotnie większa niż hydroliza epimerów L,D. Analogiczne badania na estrach tripeptydowych nie przyniosły podobnych wyników. Wydłużenie łańcucha peptydowego o jeden aminokwas powodował zmniejszenie różnicy pomiędzy szybkością hydrolizy jednego oraz drugiego diastereoizomeru do 4 razy co spowodowało znaczny spadek selektywności tej reakcji.¹⁴⁶

Analizując przykłady enzymatycznej syntezy peptydów można zauważyć, że ma ona zastosowanie do otrzymywania związków peptydowych nie dłuższych niż zbudowanych z dwóch reszt aminokwasowych. Ponadto enzymy katalizują reakcje, w których substraty mają naturalną konfigurację na α -węglach. Właściwość tą można jednak wykorzystać w reakcjach rozdziału kinetycznego również do otrzymywania diastereomerycznie czystych peptydów o nienaturalnej konfiguracji. Niekiedy rezultaty są rewelacyjne i niemożliwe do powtórzenia w warunkach klasycznej, chemicznej syntezy. Dlatego też poszukuje się nowych rozwiązań, które pozwoliłyby zastosować procedury enzymatyczne do diastereoselektywnej syntezy tripeptydów oraz dłuższych ich homologów.

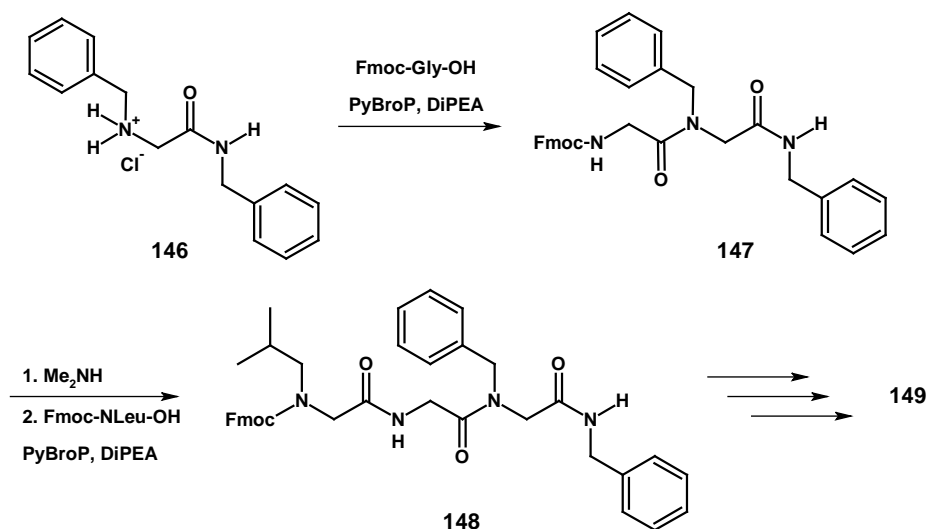
5. Synteza i właściwości peptoidów

Najważniejszymi różnicami między właściwościami peptoidów o strukturze *N*-podstawionych oligoglicyn i peptydów, które wpływają na aktywność biologiczną tych związków są:

- 1) Zwiększenie lipofilowości peptoidów poprzez podstawienie atomu azotu w hydrofilowym drugorzędowym wiązaniu amidowym z utworzeniem amidu trzeciorzędowego; z właściwością tą wiąże się lepsza zdolność przenikania lipidowych błon komórkowych co wpływa na lepszą biodostępność związku stosowanego jako terapeutyk podawany drogą doustną; prowadzi to także do utracenia zdolności tworzenia wiązania wodorowego, którego amidy drugorzędowe są donorami, oraz tworzenia struktur drugorzędowych przez tego typu struktury.
- 2) Wyższa odporność peptoidów na proteolityczne działanie enzymów. Powoduje to wyższą tolerancję względem enzymów występujących w przewodzie pokarmowym.
- 3) Zwiększenie labilności konfiguracji wiązania peptydowego, występującego jako częściowo podwójne w formach *cis* i *trans* z przewagą drugiego izomeru. Podstawienie atomu azotu z utworzeniem trzeciorzędowego wiązania amidowego powoduje zmniejszenie różnicy energii pomiędzy izomerami i zwiększenie występowania izomeru *cis* co niekiedy daje w rezultacie lepsze dopasowanie struktury związku do receptora z nim oddziałującego.^{147,148}
- 4) Dodatkowo w przypadku peptoidów usunięcie łańcuchów bocznych z węgla α powoduje utratę chiralności na tym centrum co pociąga za sobą wyeliminowanie ryzyka racemizacji (epimeryzacji) i ułatwienie wielu procedur syntezy tych związków.

Peptoidy w postaci *N*-podstawionych oligoglicyn stanowią szczególną grupę związków, a wynika to z ich właściwości zbliżonych do peptydów oraz stosunkowo wysokiej stabilności.⁴³ Po raz pierwszy zostały zdefiniowane wraz z określeniem ich właściwości w 1992 roku przez Zuckermanna.⁴² Istnieje wiele doniesień na temat właściwości biologicznych związków o strukturze peptoidów. Grupa Kodadka skupiła się nad badaniem przenikalności błon komórkowych przez peptoidy¹⁴⁹ oraz ich wcześniej opisaną aktywności inhibitorów regulatorowej części proteasomu 19S (RIP-1, **111**).^{126,127} Znane są również peptoidy o aktywności inhibitorów proteazy HIV-1,¹⁵⁰ antyproliferacyjnie działające na komórki nowotworowe piersi, płuc oraz okrężnicy¹⁵¹ oraz o działaniu antybakteryjnym.¹⁵²

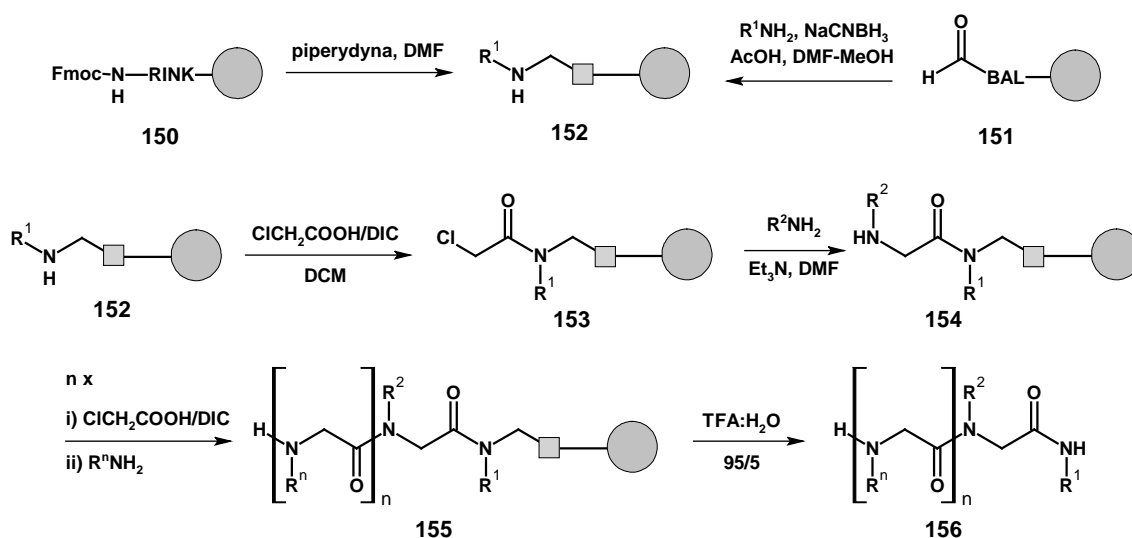
Istnieje kilka metod otrzymywania peptoidów. Do otrzymywania peptoidów stosuje się zarówno technikę syntezy w roztworze jak i na nośniku stałym. Historycznie pierwszą z nich jest zaproponowana przez Zuckermanna synteza polegająca na powtarzanej reakcji sprzęgania monomerów peptoidowych o strukturze *N*-alicylowanych glicyn. Jeden z monomerów jest w tym przypadku zabezpieczony (najczęściej grupą Fmoc) na *N*-końcu (np. Fmoc-Gly-OH – brak łańcucha bocznego, Fmoc-NLeu-OH – łańcuch boczny leucyny (*i*-Bu) przeniesiony na atom azotu). Po reakcji sprzęgania dokonuje się odbezpieczenia grupy aminowej i ponownego sprzęgania z kolejnym monomerem z wolną grupą karboksylową (Schemat 43).^{42,153}



Schemat 43. Synteza peptoidów w reakcji sprzęgania monomerów peptoidowych.

Druga z metod jest modyfikacją wyżej opisanej i często stosowana jest w technice syntezy na stałym nośniku. Jako nośnika najczęściej używa się żywicy polistyrenowej z łącznikiem w postaci amidu Rinka (**150**) z zabezpieczoną pierwszorzędową grupą aminową, na której po odbezpieczeniu budowany jest łańcuch peptoidu od C- do N-końca. Stosowanie innego łącznika, tzw. łącznika amidowego szkieletowego (BAL – ang. backbone amide linker) (**151**), polega na utworzeniu na jego wolnej grupie aldehydowej w reakcji reduktywnego aminowania ugrupowania aminowego (drugorzędowego) **152**, na którym budowany jest szkielet peptoidu. W odróżnieniu od metody z zastosowaniem żywicy Rinka otrzymana grupa aminowa wchodzi w tym wypadku w skład jednej z wewnętrznych (szkieletowych) grup amidowych pozostawiając jednocześnie wolny C-koniec peptoidu, który można dowolnie modyfikować przed ostatecznym usunięciem z nośnika. Łączniki te stosuje się również w syntezie peptydów. W reakcji sprzęgania (czynnik sprzęgający DIC – diizopropylkarbodiimid) kwasu halogenooctowego z drugorzędową grupą aminową w

związku **152** tworzone jest wiązanie amidowe. W następnym etapie prowadzi się alkilowanie kolejnej aminy pierwszorzędowej po czym ponownie w reakcji sprzęgania z kwasem halogenooctowym tworzone jest drugie wiązanie amidowe. Ten dwuetapowy proces powtarza się do momentu otrzymania łańcucha o pożądanej długości **155**. Ostatnim etapem syntezy jest usunięcie łącznika w reakcji z kwasem trifluorooctowym i uwolnienie łańcucha peptoidowego **156** (Schemat 44).^{151,154,155}



Schemat 44. Synteza peptoidów na nośniku stałym z łącznikiem w postaci amidu Rinka i BAL w procesie powtarzanych sekwencji reakcji (a) sprzęgania aminy z kwasem chlorooctowym (b) alkilowania aminy pierwszorzędowej; $R_1 = \text{H, Alk}$.

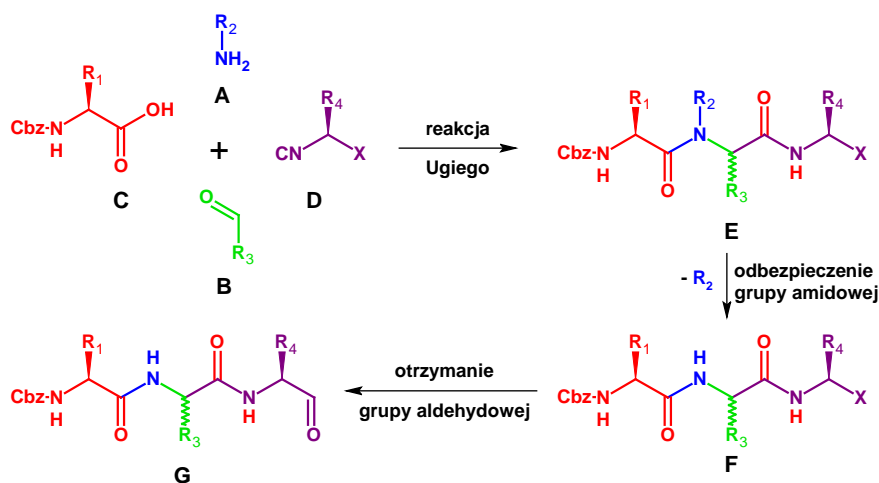
Analizując syntezę peptoidów można dostrzec jeszcze jedną zaletę w stosunku do syntezy peptydów. Poprzez dobór odpowiedniej aminy można bowiem łatwo wprowadzać do ich struktury dowolny łańcuch boczny jako podstawnik amidowy, a ich różnorodność ograniczona jest jedynie dostępem do odpowiednich amin. W ten sposób można zatem tworzyć peptoidy (peptydomimetyki) posiadające dowolne niekodowane łańcuchy boczne w swojej strukturze.

6. Wyniki własne

6.1. Cel badań

Kluczowym założeniem pracy było opracowanie nowej, wydajnej metody syntezy tripeptydów z C-kończącą grupą aldehydową, posiadających dowolną konfigurację absolutną na każdym centrum stereogenicznym. W metodzie tej postanowiono zastosować multikomponentową reakcję Ugięgo, która jest znakomitym narzędziem do otrzymywania związków o zróżnicowanych strukturach peptydowych. Fakt tworzenia w tej reakcji mieszaniny dwóch diastereoizomerycznych produktów, po opracowaniu metody ich rozdzielenia, można wykorzystać do szybkiego tworzenia par związków docelowych. W przypadku klasycznych metod otrzymywania tego typu związków wymagane jest przeprowadzenie wieloetapowych, równoległych syntez.

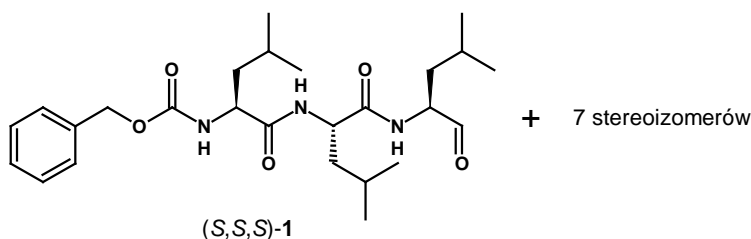
Ogólna koncepcja syntezy aldehydów tripeptydowych **G** z zastosowaniem reakcji multikomponentowej przedstawiona jest na Schemacie 1. Poszczególnymi etapami planowanej syntezy były: (a) budowa szkieletu tripeptydowego w reakcji Ugięgo, (b) odbezpieczenie grupy amidowej oraz (c) funkcjonalizacja prekursora grupy aldehydowej (grupa X w związkach o strukturze **F**) z otrzymaniem produktów **G**. Metodologia wymaga zastosowania chiralnych, enancjomerycznie czystych reagentów karboksylowych **C** i izocyjankowych **D** w postaci pochodnych α -aminokwasowych. Ponieważ literaturowo znane izocyjanki tego typu są związkami niestabilnymi w warunkach reakcji Ugięgo, dodatkowym problemem do rozwiązania było opracowanie struktury oraz metody syntezy



Schemat 1. Ogólna koncepcja syntezy tripeptydów z C-kończącą grupą aldehydową.

enancjomerycznie stabilnych izocyjanków. Produkty reakcji Ugiiego w przypadku stosowania tego typu chiralnych reagentów powstają jako mieszanina diastereoizomerów, dlatego metodologia wymagała opracowania sposobu rozdziału tych mieszanin.

Kolejnym celem pracy było zastosowanie opracowanej metody do syntezy wszystkich stereoizomerów jednego z najbardziej aktywnych i najczęściej badanych inhibitorów proteasomów - MG-132 (Cbz-Leu-Leu-Leu-H, **1**) (Rysunek 1).



Rysunek 1. Struktura docelowych tripeptydów z C-końcową grupą aldehydową: MG-132 (S,S,S)-**1** oraz jego 7 stereoizomerów.

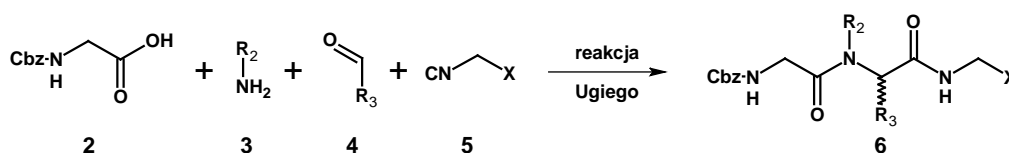
Metodę postanowiono również zastosować do syntezy tripeptydów z innymi niż aldehydowa grupami C-końcowymi i tripeptydów z α,α -dipodstawionymi aminokwasami. Do struktur peptydowych postanowiono wprowadzić także elementy niepeptydowe poprzez zastosowanie do reakcji Ugiiego reagentów karboksylowych niebędących pochodnymi aminokwasowymi.

Metody syntezy powinny być maksymalnie ogólne i możliwe do zastosowania dla szerokiej klasy związków. Metodę postanowiono również zastosować do syntezy analogów peptydów o strukturze peptoidów (*N*-alkilowanych oligoglicyn) z N-końcowymi grupami fluoroforowymi. Związki tej klasy są bardzo pożądanymi markerami do badań procesów komórkowych.

W celu przejrzystości pracy numerację związków, rysunków, schematów i tabel rozpoczęto w tej części od początku. W przypadku odnoszenia się do elementów z Części literaturowej pracy zostanie to wyraźnie wskazane.

6.2. Badania nad opracowaniem ogólnej metody syntezy tripeptydów z C-kończącą grupą aldehydową

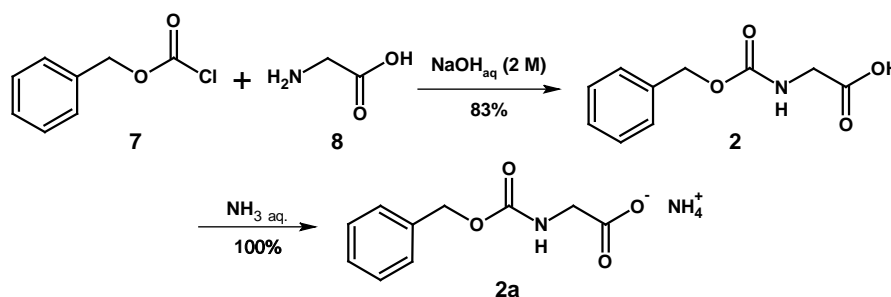
Celem pierwszych badań było opracowanie ogólnej metody syntezy tripeptydów z C-kończącą grupą aldehydową. Synteza tripeptydów w reakcji Ugiego możliwa jest przy zastosowaniu reagentów kwasowych **2** oraz izocyjankowych **5** w postaci pochodnych α -aminokwasowych. Przy stosowaniu reagentów chiralnych, enancjomerycznie czystych istnieje ryzyko racemizacji oraz powstawania skomplikowanych mieszanin diastereoizomerycznych produktów. W celu uniknięcia tego zjawiska i uproszczenia badań na tym etapie stosowano reagenty w postaci pochodnych najprostszego achiralnego α -aminokwasu, czyli glicyny – kwasu aminooctowego. Ponadto istotnym punktem tej części pracy było opracowanie takich struktur izocyjanków **5**, które posiadałyby ugrupowania X będące prekursorami grupy aldehydowej (Schemat 2).



Schemat 2. Schemat ogólny syntezy tripeptydów z C-kończącym prekursorem grupy aldehydowej.

6.2.1. Synteza reagentów kwasowych

Dobór reagenta kwasowego był w tym wypadku jednoznaczny, a związkiem tym była *N*-benzyloksykarbonylglicyna (Cbz-Gly-OH, **2**), otrzymana z wydajnością 83% w reakcji *N*-acylowania glicyny (**8**) chloromrówczanem benzylu (**7**) w środowisku alkalicznym (Schemat 3). Otrzymano również sól amonową **2a** poprzez reakcję kwasu **2** z amoniakiem w roztworze wodnym. Produkt otrzymano z wydajnością ilościową. Sól amonową wykorzystano w dalszej części badań jako reagent wnoszący do reakcji Ugiego zarówno składnik kwasowy jak i aminowy. Sól stosowano w reakcjach, w których podjęto próby otrzymania szkieletu tripeptydowego bez grupy zabezpieczającej wiązanie amidowe.



Schemat 3. Synteza *N*-benzyloksykarbonylglicyny (**2**) oraz jej soli amonowej **2a**.

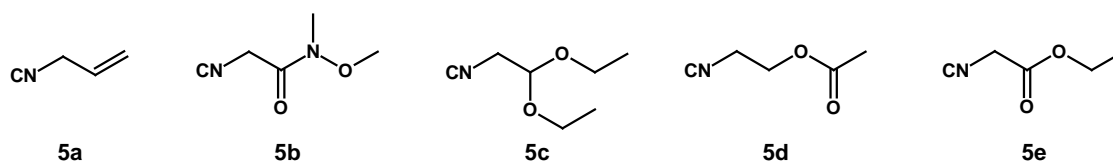
6.2.2. Badania nad syntezą achiralnych izocyjanków

Jedną z właściwości izocyjanków jest ich nieprzyjemny, ostry i duszący zapach, który różni się w zależności od struktury poszczególnych związków. Ponadto, poza kilkoma wyjątkami izocyjanków krystalicznych, związki te najczęściej są substancjami ciekłymi i bardzo lotnymi co intensyfikuje rozprzestrzenianie się zapachu. Należy zatem zachowywać szczególną uwagę przy syntezie i używaniu tego typu związków.

W tej części pracy celem było opracowanie struktur izocyjanków **5** posiadających grupy X, których prosta funkcjonalizacja prowadzi do otrzymania grupy aldehydowej. Zaproponowano pięć grup, będących prekursorami grupy aldehydowej. Grupami tymi oraz metodami ich funkcjonalizacji są:

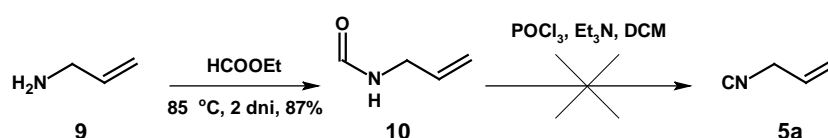
- grupa winylowa – ozonoliza;
- amid Weinreba – redukcja wodorkiem litowoglinowym;
- grupa acetalowa – hydroliza katalizowana kwasem;
- grupa acetoksylova – hydroliza do alkoholu oraz selektywne utlenienie;
- grupa estrowa – redukcja do alkoholu oraz selektywne utlenienie.

Izocyjanki **5a** – **5e** posiadające wyżej wymienione grupy przedstawione są na Rysunku 2.



Rysunek 2. Izocyjanki **5a** – **5e** z prekursorami grupy aldehydowej.

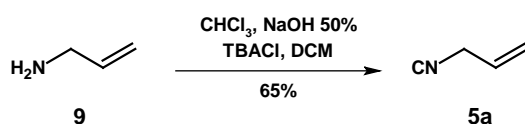
Izocyjanek allilowy (**5a**) był historycznie pierwszym izocyjankiem. Był on otrzymany w 1859 r. przez Lieke w reakcji jodku allilu z cyjankiem srebra.¹⁵⁶ Z powodu wysokiej toksyczności drugiego z reagentów metoda ta jest obecnie rzadko stosowana do syntezy izocyjanków. Do syntezy izocyjanku **5a** zaproponowano zatem opisaną w punkcie 2.1.4. Części literaturowej metodę polegającą na formylowaniu pierwszorzędowej grupy aminowej oraz odwadnianiu tak otrzymanej grupy formamidowej. Zgodnie z nią, w reakcji formylowania alliloaminy (**9**) mrówczanem etylu otrzymano formylową pochodną **10** z wydajnością 87% (Schemat 4). Etap odwadniania prowadzono z zastosowaniem POCl₃ z



Schemat 4. Synteza izocyjanku allilowego (**5a**) na drodze formylowania i odwadniania alliloaminy (**9**).

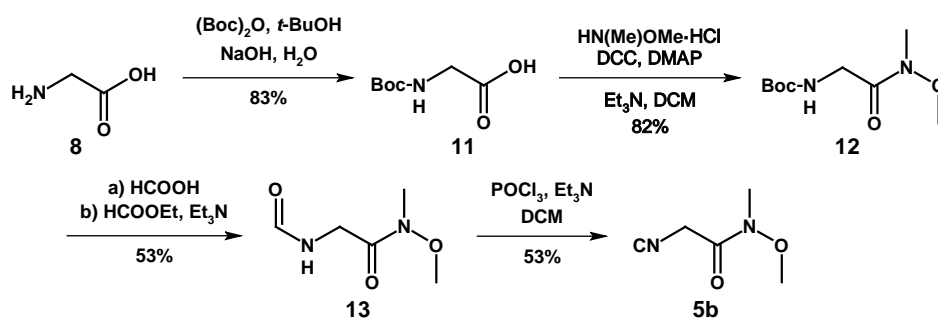
trietyloaminą. W reakcji otrzymano izocyjanek **5a**, o czym świadczył nieprzyjemny, charakterystyczny zapach. Produktu reakcji nie wydzielono jednak w postaci czystej. Wynikało to po części z wysokiej lotności produktu i utrudnionym wydzieleniem na drodze destylacji. Wszelkie próby oczyszczenia produktu przy pomocy chromatografii kolumnowej również nie dały oczekiwanego efektu. Problem z wydzieleniem produktu mógł również wynikać z niskiej wydajności reakcji. Wszelkie bezpośrednie analizy izocyjanek allilowego były utrudnione ze względu na wyjątkowo nieprzyjemny zapach tego związku. Jest on zaliczany do ścisłej czołówki związków o najbardziej nieprzyjemnym znanym zapachu.¹⁵⁷

Kolejnym podejściem do syntezy izocyjanek allilowego było zastosowanie metody Hofmanna prowadzonej w warunkach katalizy przeniesienia międzyfazowego (PTC).¹⁵⁸ W metodzie tej izocyjanek **5a** otrzymuje się bezpośrednio z alliloaminy w reakcji z dichlorokarbenem generowanym *in situ* z chloroformu w warunkach silnie zasadowych (Schemat 5). Produkt po ekstrakcji wydzielono na drodze destylacji z wydajnością 65%. Temperatura wrzenia produktu była zgodna z danymi literaturowymi. Zaletą tej metody jest możliwość prowadzenia reakcji w dużej skali dzięki stosowaniu prostych reagentów. Wiąże się to również z ułatwieniem etapu oczyszczania produktu. Metoda Hofmanna jest stosowana do potwierdzenia obecności pierwszorzędowych amin czego dowodzi pojawiający się charakterystyczny dla izocyjaneków zapach.



Schemat 5. Synteza izocyjanek allilowego (**5a**) w warunkach reakcji PTC.

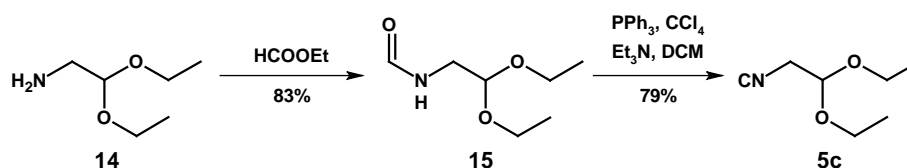
Następnym izocyjanekiem z prekursorem grupy aldehydowej był związek **5b** z ugrupowaniem amidu Weinreba (kwasu *N,O*-dimetylohydroksamowego).⁹⁴ Związek ten otrzymano był zgodnie z metodą opisaną przez Pelkey (Schemat 6).¹⁵⁹ W pierwszym etapie otrzymano *N*-benzyloksykarbonyloglicynę (**11**), którą poddano sprzęganiu z *N,O*-dimetylohydroksyloaminą otrzymując amid Weinreba **12**. Następnie grupę aminową



Schemat 6. Synteza izocyjanek **5b** z grupą amidu Weinreba.

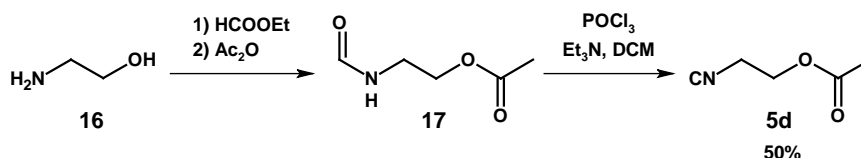
odbezpieczono w reakcji z kwasem mrówkowym i formylowano mrówczanem etylu do otrzymania pochodnej formamidowej **13**, którą odwodniono z zastosowaniem POCl₃. Izocyjanek **5b** otrzymano zatem z glicyny w pięcioetapowym procesie z całkowitą wydajnością 19%. Poszczególne etapy nie były optymalizowane. Izocyjanek ten został wydzielony w postaci kryształów.

Izocyjanek **5c** z grupą dietyloacetalową otrzymano z 2,2-dietoksyetyloaminy (**14**) na drodze formylowania i odwadniania według procedury opisanej przez Marcacciniego (Schemat 7).¹⁶⁰ Produkt otrzymano z całkowitą wydajnością 66%.



Schemat 7. Synteza izocyjanu z grupą acetalową **5c**.

Kolejne dwa izocyjaniki **5d** i **5e** posiadają grupy estrowe. Octan 2-izocyjanoetylu (**5d**) otrzymany był z 2-aminoetanolu (**16**) na drodze następujących etapów: formylowania grupy aminowej, acetylowania grupy hydroksylowej i odwadniania grupy formamidowej w związku **17**. Produkty poszczególnych etapów były oczyszczane jedynie poprzez odparowanie składników lotnych mieszaniny. Produkt **5d** otrzymano z całkowitą wydajnością 50% (Schemat 8). Ostatni z tej grupy izocyjaników izocyjanooctan etylu (**5e**) jest związkiem komercyjnie dostępnym.¹⁶¹



Schemat 8. Synteza izocyjanu **5e** jako pochodnej 2-aminoetanolu.

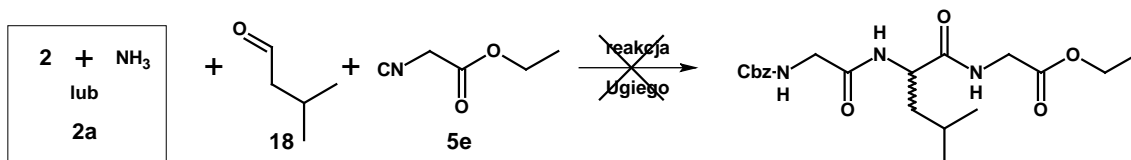
Otrzymane izocyjaniki, wykorzystano do opracowania ogólnej metodologii syntezy tripeptydów z C-końcową grupą aldehydową.

6.2.3. Badania nad zastosowaniem amoniaku jako reagenta aminowego w reakcjach Ugiego

W reakcjach Ugiego z zastosowaniem amin pierwszorzędowych powstają produkty z jedną trzeciorzędową grupą amidową. W strukturach docelowych tripeptydów **F** i **G** (Schemat 1) występują wyłącznie drugorzędowe grupy amidowe, dlatego też pojawia się konieczność przystosowania metody do otrzymywania tego typu związków. Można tego

dokonać poprzez: (a) zastosowanie amoniaku lub jego pochodnej jako reagenta aminowego, lub (b) zastosowanie aminy H₂N-R z labilną grupą R zabezpieczającą jedno z powstających w reakcji wiązań amidowych oraz usunięcie grupy R w kolejnym etapie.

W pierwszej kolejności podjęto próby zastosowania różnych postaci amoniaku jako reagenta aminowego. Reakcje prowadzono z zastosowaniem Cbz-Gly-OH (**2**) jako kwasu karboksylowego, aldehydu izowalerianowego (**18**) oraz izocyjanooctanu etylu (**5e**). Amoniak stosowano w postaci roztworu alkoholowego, soli amonowej kwasu karboksylowego **2a** lub jako 25% roztwór wodny (Schemat 9). W reakcjach obserwowano bardzo niską konwersję substratów lub powstawanie skomplikowanych mieszanin produktów bez możliwości ich wydzielenia, oczyszczenia oraz identyfikacji z zastosowaniem dostępnych metod. Dlatego też oczekiwanego produktu reakcji Ugiego w tym etapie badań nie otrzymano.



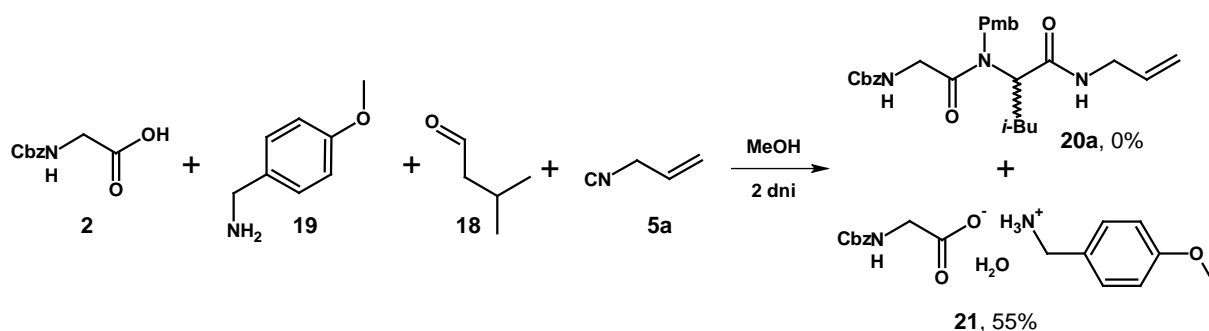
Schemat 9. Reakcja Ugiego z zastosowaniem amoniaku lub soli amonowej jako reagenta aminowego.

Rozwiązaniem zagadnienia syntezy tripeptydów typu **F** i **G** (Schemat 1) pozostało więc zastosowanie pierwszorzędowych amin z labilnymi grupami wprowadzanymi jako zabezpieczenie wiązania amidowego.

6.2.4. Badania nad syntezą szkieletu peptydowego w reakcji Ugiego

Otrzymane izocyjanki **5a** – **5e** użyto w modelowych reakcjach Ugiego. Jako aminę stosowano *p*-metoksybenzyloaminę (**19**), dzięki czemu do struktury produktu wprowadzona została reszta Pmb jako labilne zabezpieczenie wiązania peptydowego. Użyto również aldehyd izowalerianowy (**18**), który wprowadza do szkieletu peptydowego produktu resztę izobutylową formalnie przypisaną do struktury leucyny.

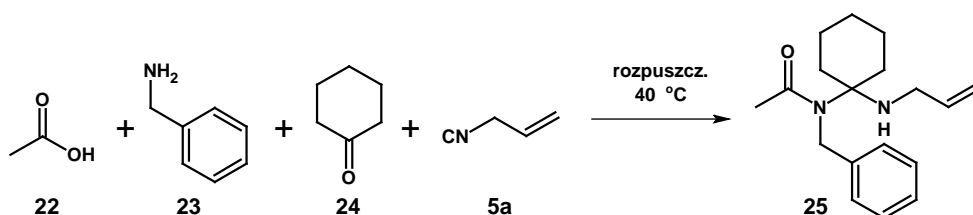
W reakcji Ugiego z izocyjankiem allilowym **5a** z zastosowaniem metanolu jako rozpuszczalnika nie otrzymano oczekiwanego produktu **20a**. Z mieszaniny reakcyjnej wytrącał się osad, który scharakteryzowano jako wodzian *N*-benzyloksykarbonyloaminooctanu *p*-metoksybenzyloamoniowego (Cbz-Gly-O⁻·Pmb-NH₃⁺·H₂O) (**21**), w skład którego wchodziły atomy pochodzące od kwasu karboksylowego **2** oraz aminy **19** (Schemat 10).



Schemat 10. Reakcja Ugiego z zastosowaniem izocyjanku allilowego (**5a**).

W reakcji z zastosowaniem układu rozpuszczalników metanol – dichlorometan osad nie wytrącał się z mieszaniny reakcyjnej jednakże konwersja substratów była niska. Po zatężeniu mieszaniny reakcyjnej ponownie wytrącił się osad soli amoniowej **21**.

Ponieważ istniało podejrzenie niskiej reaktywności izocyjanku allilowego w tej reakcji, przeprowadzono na nim reakcje modelowe z zastosowaniem benzyloaminy (**23**), cykloheksanonu (**24**) oraz kwasu octowego (**22**) (Schemat 11). Reakcje prowadzono w



Schemat 11. Modelowa reakcja Ugiego z izocyjankiem allilowym (**5a**).

temperaturze 40 °C. W reakcji z zastosowaniem dichlorometanu jako rozpuszczalnika otrzymano produkt **25** z wydajnością 63%. W reakcjach bez rozpuszczalnika z zastosowaniem cykloheksanonu w nadmiarze lub w ilości równomolowej w odniesieniu do pozostałych reagentów produkt **25** otrzymano odpowiednio z wydajnościami 17 i 45% (Tabela 1). W przeciwieństwie do reakcji przedstawionej na Schemacie 9 tworzenie produktu **25** mogło być faworyzowane poprzez zastosowanie sterycznie rozbudowanego cyklicznego ketonu jako reagenta karbonylowego.

Tabela 1. Modelowa synteza związku **25** w reakcja Ugiego z izocyjankiem allilowym (**5a**) w temperaturze 40 °C.

L.p.	Cykloheksanon	Rozpuszczalnik	wydajność [%]
1	1 eq.	DCM	63
2	9 eq.	-	17
3	1 eq.	-	45

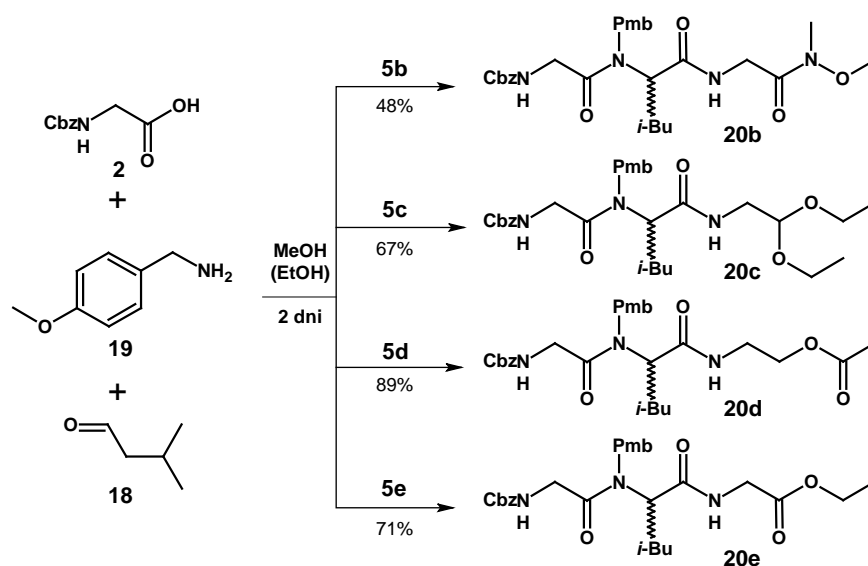
Reakcję syntezy związku **20a** powtórzono więc w warunkach reakcji w których otrzymano produkt **25** z najlepszą wydajnością. Niestety, przy zastosowaniu tych warunków, ponownie nie udało się otrzymać produktu **20a**, a jednocześnie konwersja substratów była bardzo niska. Nie wytrącał się osad jak miało to miejsce w przypadku reakcji w metanolu.

Analizując wyniki powyższych reakcji stwierdzono, że duży wpływ na wydajność reakcji Ugięgo z zastosowaniem izocyjanku allilowego ma rodzaj stosowanego reagenta karbonylowego. Reaktywność izocyjanku jest zdecydowanie wyższa w przypadku stosowania ketonu w postaci cykloheksanonu. W przypadku stosowania aldehydu izowalerianowego izocyjanek nie wchodził w reakcję z pozostałymi reagentami co prowadziło do tworzenia się soli amoniowej **21**.

W kolejnym etapie badań zastosowano izocyjanki **5b** – **5e** do syntezy tripeptydów **20b** – **20e** zawierające C-końcowe prekursory grupy aldehydowej.

W reakcjach z izocyjankami **5b** i **5d** jako rozpuszczalnika użyto metanolu. Etanol natomiast był stosowany w przypadku reakcji z izocyjankami **5c** oraz **5e** w celu uniknięcia transestryfikacji, która szczególnie łatwo zachodzi w przypadku izocyjanooctanu etylu (**5e**). W przypadku pojawienia się w trakcie reakcji problemu z rozpuszczalnością reagentów lub produktów pośrednich do mieszaniny reakcyjnej dodano dichlorometan, który powodował rozpuszczenie związków nierozpuszczalnych w alkoholach.

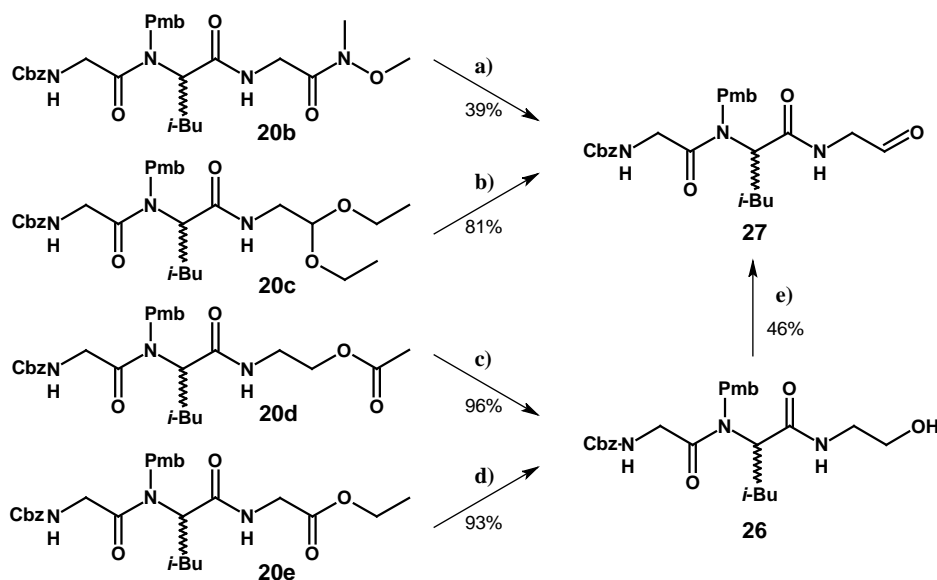
W reakcji Ugięgo z izocyjankiem **5b** otrzymano tripeptyd z C-końcowym ugrupowaniem amidowym Weinreba **20b** z wydajnością 48%. Zastosowanie izocyjanku z grupą acetalową **5c** prowadziło do tripeptydu **20c**, który wydzielono z wydajnością 67%. Najwyższą wydajnością charakteryzowała się reakcja Ugięgo z octanem 2-izocyjanoetanolu (**5d**). Produkt **20d** wydzielono z bardzo wysoką wydajnością 89%. W reakcji z izocyjanooctanem etylu (**5e**) otrzymano produkt **20e** w postaci estru etylowego z wydajnością 71%. (Schemat 12). Produkty **20b** – **20e** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej i na tym etapie nie napotkano na żadne utrudnienia.



Schemat 12. Synteza tripeptydów **20b** – **20e** w reakcjach Ugięgo z zastosowaniem izocyjanków **5b** – **5e**.

6.2.5. Badania nad opracowaniem metody funkcjonalizacji C-końcowych grup funkcyjnych - prekursorów grupy aldehydowej

Kolejnym etapem badań była synteza aldehydu **27** na drodze funkcjonalizacji C-końcowych grup w tripeptydach **20b** – **20e** (Schemat 13). Aldehyd otrzymano na drodze redukcji amidu Weinreba **20b** z zastosowaniem wodorku litowoglinowego według procedury opisaney w literaturze,¹⁶² jednakże wydajność tej reakcji była niska (39%). Ten sam produkt otrzymano poprzez hydrolizę acetalu **20c** w układzie aceton/woda. W reakcji katalizowanej kwasem *p*-toluenosulfonowym produkt **27** wydzielono z dobrą wydajnością 81%. Kolejne dwie metody syntezy modelowego aldehydu **27** były procesami dwuetapowymi, przy czym w każdej z nich produktem pierwszego etapu był alkohol **26**. Produkt reakcji Ugiego **20d**



Schemat 13. Synteza tripeptydu z C-końcową grupą aldehydową **27**; (a) LAH, THF, 10 min., -10 °C, 90 min., 0 °C (b) *p*-TosH, aceton/woda 2:1, 90 min, 50 °C; (c) NaOH_{aq}, MeOH, 30 min, temp. pok.; (d) NaBH₄, CaCl₂, LiCl, THF, 20 godz., 35 °C ; (e) TEMPO, NaClO, NaBr, woda, DCM, 50 min., 0 °C.

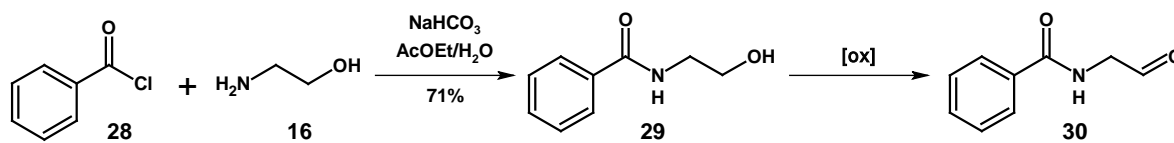
przeprowadzono w alkohol na drodze hydrolizy grupy acetoksyłowej, katalizowanej zasadą. Produkt **26** otrzymano z wysoką wydajnością 96%. Z kolei ester **20e** poddano reakcji redukcji z zastosowaniem borowodorku sodu modyfikowanego dodatkiem soli, chlorku wapnia oraz chlorku litu. W reakcji tej otrzymano alkohol **26** z wydajnością 93%. W ostatnim etapie alkohol poddano selektywnemu utlenianiu do aldehydu w reakcji z podchlorynem sodu katalizowanej rodnikowo reagentem TEMPO (2,2,6,6,-tetrametyłopiperdyd-1-oksyl). Aldehyd **27** otrzymano tą metodą z wydajnością 46%. Reakcji utleniania alkoholu **26** na tym etapie badań nie optymalizowano.

Ponieważ wydajności reakcji hydrolizy grupy acetoksyłowej w **20d** oraz redukcji grupy estrowej w **20e** były bardzo wysokie, właśnie te drogi syntezy aldehydów

postanowiono wykorzystać w dalszych etapach badań. Metodologia ta wymaga jednak optymalizacji etapu utleniania grupy hydroksylowej oraz opracowania metody usuwania grupy zabezpieczającej wiązanie amidowe. Ponadto metody syntezy izocyjanków **5d** i **5e** powinny mieć również zastosowanie do syntezy chiralnych izocyjanków otrzymywanych z leucyny. W przypadku syntezy chiralnych izocyjanków z grupą acetalową jako analogów izocyjanku **5c** konieczne by było przeprowadzenie wieloetapowej syntezy odpowiednich substratów.

6.2.6. Badania nad opracowaniem optymalnych warunków selektywnego utleniania grupy alkoholowej w pochodnych 2-amidoetanolu

Do opracowania metody selektywnego utleniania alkoholu pierwszorzędowego do aldehydu jako modelowy substrat wybrano *N*-(2-hydroksyetylo)benzamid (**29**). Otrzymano go w reakcji *N*-acylowania 2-aminoetanolu (**16**) chlorkiem benzoilu (**28**) (Schemat 14). Alkohol **29** poddano utlenianiu do aldehydu **30** z zastosowaniem sześciu znanych literaturowo metod



Schemat 14. Schemat syntezy modelowego alkoholu **29** oraz selektywnego utleniania do aldehydu **30**.

utleniania (Tabela 2). W reakcji katalizowanej reagentem TEMPO otrzymano produkt z wydajnością 67%, jednakże wadą metody jest konieczność oczyszczania produktu poprzez wielokrotną ekstrakcję, która nie zawsze jest w tej metodzie procesem wydajnym. Kolejną metodą było utlenianie w warunkach Swerna (chlerek oksalilu, DMSO). Produkt w tym przypadku wydzielono z wydajnością 59%. Wadą tej metody jest powstawanie produktów ubocznych w tym związku o nieprzyjemnym zapachu, dwutlenku siarki, oraz tak jak w poprzednim przypadku uciążliwy etap ekstrakcji. Aldehyd **30** otrzymano z dobrą wydajnością 85% w reakcji z zastosowaniem reagenta Dess-Martina. Reakcja ta charakteryzuje się łatwym przerobem oraz brakiem produktów ubocznych. Przy zastosowaniu PCC jako czynnika utleniającego otrzymano skomplikowaną mieszaninę reakcyjną, a produkt **30** był obserwowany dopiero po dłuższym czasie (24 godziny). Nie udało się go wydzielić w formie czystej. W pozostałych dwóch metodach z użyciem chlorku cyjanurowego w DMSO oraz kompleksu pirydyny z trójtlenkiem siarki w DMSO, oczekiwanego produktu nie obserwowano a konwersja była bardzo niska. W obydwu metodach odzyskano nieprzereagowany substrat.

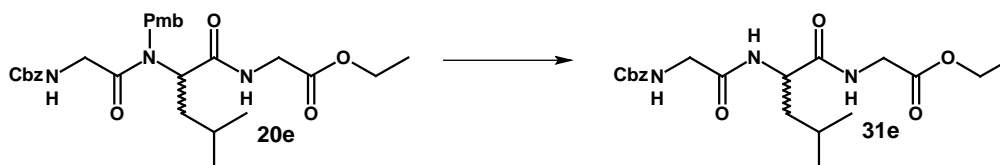
Ponieważ w reakcji z zastosowaniem reagenta Dess-Martina produkt wydzielono z najwyższą wydajnością a jednocześnie proces oczyszczania był prosty i efektywny właśnie tą metodę stosowano w kolejnych etapach badań, w których prowadzono reakcję utleniania grupy alkoholowej do aldehydowej.

Tabela 2. Metody selektywnego utleniania alkoholu **29** do aldehydu **30**.

L.p.	Warunki utleniania 29 do 30	Wydajność [%]	Uwagi
1	TEMPO, KBr, NaClO, DCM, H ₂ O	67	problemy z ekstrakcją
2	(COCl) ₂ , DMSO, DCM, TEA	59	zapach, ekstrakcja, zanieczyszczenia
3	reagent Dess-Martina	85	łatwy oczyszczenie produktu
4	PCC, DCM	-	zanieczyszczenia, długi czas reakcji
5	chlorek cyjanurowy, DMSO, TEA, DCM	-	brak produktu
6	Pyr-SO ₃ , DMSO, TEA, DCM	-	brak produktu

6.2.7. Badania nad usunięciem grupy zabezpieczającej wiązanie peptydowe

Kolejnym etapem pracy było opracowanie metody usuwania grupy zabezpieczającej wiązanie peptydowe w produktach reakcji Ugiego. W pierwszej kolejności podjęto próbę usunięcia grupy Pmb ze związku **20e** (Schemat 15). Grupa 4-metoksybenzylowa należy do labilnych zabezpieczeń zarówno amin jak i amidów drugorzędowych i istnieje wiele udokumentowanych metod usuwania tej grupy. Najczęściej stosowanymi czynnikami usuwającymi grupę Pmb są azotan cerowoammonowy (CAN)¹⁶³ oraz kwas trifluoroctowy.^{29,164}



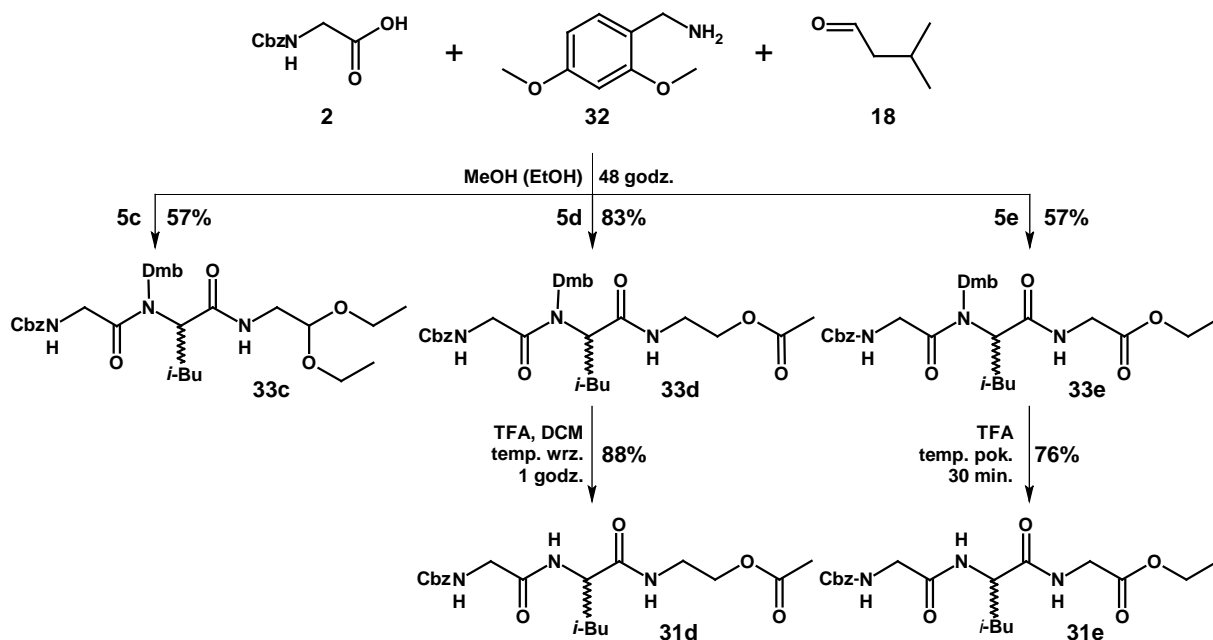
Schemat 15. Usunięcie grupy 4-metoksybenzylowej jako zabezpieczenia wiązania amidowego.

Przy zastosowaniu tych reagentów nie udało się wydzielić produktu, a obserwowana konwersja substratu była bardzo niska. W reakcji z kwasem trifluoroctowym obserwowano jedynie śladowe ilości produktu **31e**. W reakcji z CAN produktu nie obserwowano.

Następnie zastosowano reagent utleniający Jonesa (CrO₃, H₂SO₄, H₂O). W tych warunkach otrzymano produkt **31e**, który wydzielono z wydajnością 18%. Niska wydajność wynikała z niepełnej konwersji substratu **20e**, który odzyskano z wydajnością 43%.

Ponieważ usuwanie grupy 4-metoksybenzylowej, zabezpieczającej wiązanie amidowe, nie było procesem wydajnym postanowiono zmodyfikować strukturę tej grupy. Jako grupę zabezpieczającą wybrano więc bardziej labilną grupę 2,4-dimetoksybenzylową (Dmb). Do reakcji Ugiego zastosowano zatem 2,4-dimetoksybenzylaminę (**32**) oraz izocyjanki **5c**, **5d** i

5e. Otrzymano produkty **33c**, **33d** i **33e**, odpowiednio z wydajnościami 57, 83 i 57% (Schemat 16).



Schemat 16. Synteza aldehydu **35** z zastosowaniem 2,4-dimetoksybenzylaminy do reakcji Ugiego i dalszych funkcjonalizacji produktów tych reakcji.

Otrzymane produkty reakcji Ugiego poddano reakcjom odbezpieczania wiązania amidowego. W przypadku prób usunięcia grupy Dmb ze związku **33d** z zastosowaniem azotanu cerowoamonowego ponownie nie otrzymano oczekiwanego produktu **31d**. Grupę Dmb skutecznie usunięto z produktu **33d** w obecności kwasu trifluorooctowego użytego w nadmiarze. Do pełnej konwersji, osiągniętej po 1 godzinie, wymagane było podniesienie temperatury do temperatury wrzenia rozpuszczalnika (DCM). Produkt **31d** otrzymano tą metodą z wysoką wydajnością 88%. Analogicznie grupę Dmb usunięto z produktu reakcji Ugiego z grupą estrową **33e**. W tej reakcji pełną konwersję osiągnięto po 30 minutach w temperaturze pokojowej przy zastosowaniu TFA w nadmiarze bez dodatku rozpuszczalnika. Produkt **31e** otrzymano z wydajnością 76%. Wyniki reakcji usuwania grup Pmb i Dmb z zabezpieczonych tripeptydów skompletowane są w Tabeli 3.

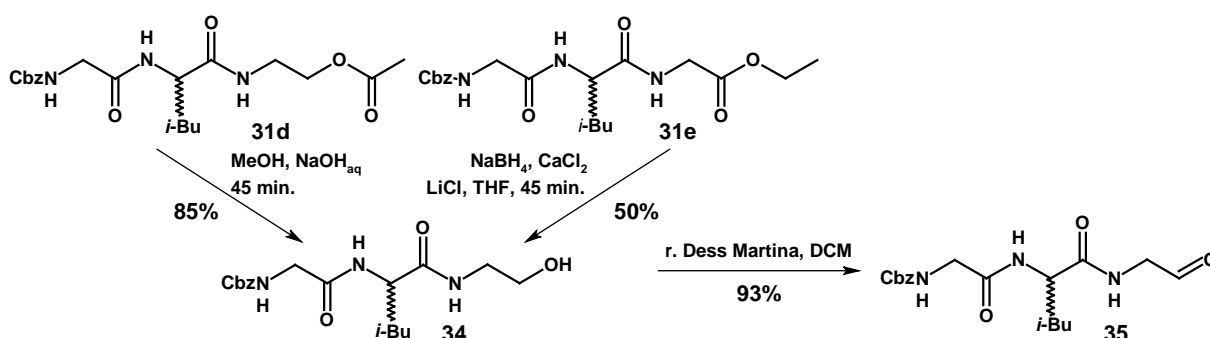
Tabela 3. Wyniki usuwania grup zabezpieczających Pmb i Dmb.

Lp.	Substrat	Grupa zabezp.	Warunki odbezpiep.	Produkt	Wydajność [%]
1	20e	Pmb	CAN, MeCN, woda, temp. pok., 1 godz.	31e	-
2	20e	Pmb	reagent Jonesa, temp. pok., 1 godz.	31e	18
3	20e	Pmb	TFA, temp. wrz., 1 godz.	31e	< 5
4	33d	Dmb	CAN, MeCN, woda, temp. pok., 1 godz.	31d	-
5	33d	Dmb	TFA, temp. pok., 30 min	31d	88
6	33e	Dmb	TFA, DCM, temp. wrz., 1 godz.	31e	76

Z otrzymanych rezultatów wynika, że odpowiednią grupą zabezpieczającą wiązanie amidowe wprowadzaną do struktury tripeptydów w reakcji Ugiego jest grupa 2,4-dimetoksybenzylowa. Jednocześnie skutecznym czynnikiem usuwającym tą grupę jest kwas trifluorooctowy stosowany jednak w warunkach zależnych od struktury substratu.

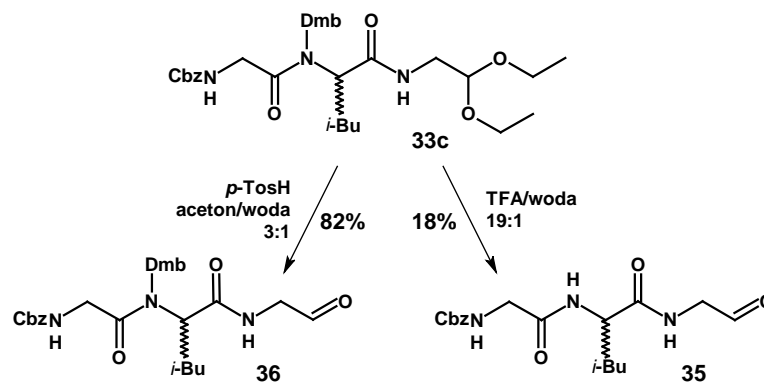
6.2.8. Synteza tripeptydu z C-końcową grupą aldehydową bez zabezpieczenia wiązania amidowego

W kolejnym etapie, wykorzystując metodologię opracowaną dla związków zabezpieczonych grupą Pmb (Schemat 13), funkcjonalizacji poddano C-końcowe grupy funkcyjne w związkach **31d** oraz **31e**. Tripeptyd z grupą acetoksyłową **31d** poddano reakcji hydrolizy natomiast związek z grupą estrową **31e** zredukowano do alkoholu **34**. Produkt ten otrzymano odpowiednio z wydajnościami 88 i 50%. Alkohol **34** z zastosowaniem zoptymalizowanej metody selektywnego utleniania (reagent Dess-Martina) przeprowadzono w aldehyd **35** z bardzo wysoką wydajnością 93% (Schemat 17).



Schemat 17. Synteza aldehydu **35** z zastosowaniem 2,4-dimetoksybenzylaminy do reakcji Ugiego i dalszych funkcjonalizacji produktów tych reakcji.

Dalszej funkcjonalizacji poddano również produkt reakcji Ugiego z grupą acetalową **33c**. Ponieważ związek ten posiada w swej strukturze dwie kwasolabilne grupy, czyli grupę Dmb oraz grupę acetalową, ideą było opracowanie metody jednoczesnego usunięcia grupy Dmb oraz hydrolizy grupy acetalowej. Wydajna metoda równoległej funkcjonalizacji tych grup pozwoliłaby zmniejszyć ilość etapów syntezy aldehydu **35**. Analizując poprzednie wyniki stwierdza się, że do wydajnego usunięcia grupy Dmb niezbędna jest obecność TFA. Z kolei hydroliza grupy acetalowej prowadząca do otrzymania grupy aldehydowej możliwa jest w obecności wody w środowisku kwaśnym. W pierwszej kolejności przeprowadzono reakcję z zastosowaniem kwasu *p*-toluenosulfonowego analogicznie do reakcji hydrolizy związku **22c** (Schemat 18). W tym wypadku otrzymano jedynie produkt hydrolizy grupy acetalowej **36** z wydajnością 82%. Nie obserwowano produktu reakcji odbezpieczenia wiązania amidowego.



Schemat 18. Synteza tripeptydów z C-kończącą grupą aldehydową **35** i **36** w reakcji hydrolizy grupy acetalowej. Najskuteczniejszym w reakcji jednoczesnego usunięcia grupy Dmb oraz hydrolizy grupy acetalowej okazał się układ TFA/woda (19:1). W tych warunkach aldehyd **35** otrzymano z wydajnością 18%. Wydajność tej reakcji była zbyt niska, aby metodę tą można by wykorzystać w dalszych etapach badań (Schemat 18).

6.2.9. Podsumowanie etapu badań nad modelową syntezą tripeptydów z C-kończącą grupą aldehydową

Analizując wyniki tego etapu badań można wyciągnąć kilka wniosków. Odpowiedni dobór reagentów aminowych oraz izocyjankowych umożliwia przeprowadzenie wydajnej syntezy związków docelowych. Izocyjankami posiadającymi grupy funkcyjne, których prosta oraz wydajna funkcjonalizacja prowadzi do otrzymania grupy aldehydowej, są octan 2-izocyjanoetylu (**5d**) oraz izocyjanooctan etylu (**5e**). Są to pochodne achiralnego aminokwasu - glicyny oraz produktu jej redukcji - glicynolu. Ponadto metody otrzymywania izocyjanków **5d** i **5e** wydają się być najprostsze do przeniesienia na syntezę odpowiednich pochodnych z chiralnych α -aminokwasów. Z kolei odpowiednim wyborem jeśli chodzi o reagent aminowy jest 2,4-dimetoksybenzyloamina (**32**). Zastosowanie tej aminy w reakcji Ugiego powoduje wprowadzenie do struktury produktu labilnego zabezpieczenia wiązania amidowego, które jest łatwo usuwalne w obecności kwasu trifluorooctowego. Najbardziej wydajną metodą selektywnego utleniania alkoholi w tej grupie związków okazała się metoda z zastosowaniem reagenta Dess-Martina.

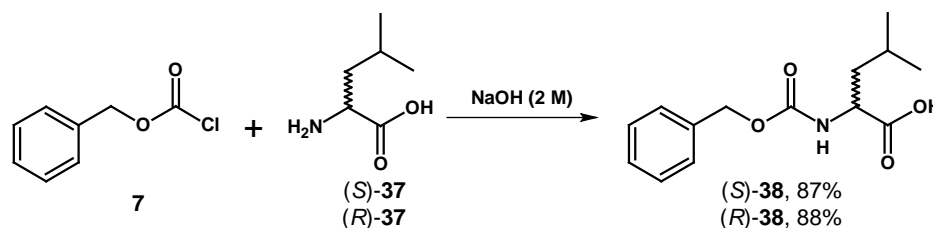
6.3. Badania nad syntezą chiralnych substratów reakcji Ugiego

Docelowo w tej pracy grupa związków składa się ze wszystkich diastereoizomerów tripeptydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al. Poprzez sprecyzowanie ogólnego schematu zastosowania

reakcji Ugiego do syntezy tripeptydów z C-kończącą grupą aldehydową można stwierdzić, że zarówno reagent kwasowy jak i izocyjankowy w tym wypadku powinien być pochodną leucyny. Jednocześnie w celu otrzymania wszystkich możliwych diastereoizomerów produktu konieczne jest dysponowanie każdym z dwóch enancjomerów chiralnych substratów w postaci czystej. Spełnienie tego warunku jest niezbędne do otrzymania w wyniku reakcji Ugiego mieszanin złożonych z nie więcej niż dwóch diastereoizomerycznych produktów. Zwrócono również uwagę na opracowanie struktury izocyjanku nieracemizującego w warunkach przechowywania oraz w warunkach reakcji Ugiego.

6.3.1. Synteza chiralnych kwasów karboksylowych

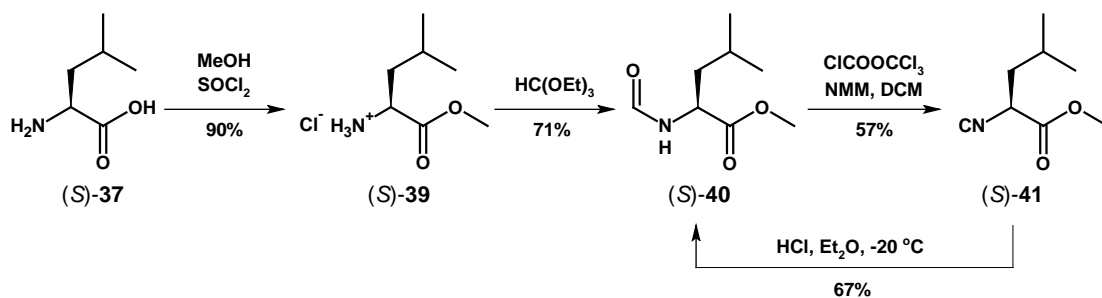
Poprzez analogię do kwasu karboksylowego **2** używanego w modelowych reakcjach syntezy tripeptydów związek stosowany do otrzymywania produktów docelowych **1** powinien być pochodną leucyny i mieć strukturę *N*-benzyloksykarbonylleucyny (**38**). Obydwa enancjomery tego produktu otrzymano w reakcjach *N*-acylowania (*S*)- oraz (*R*)-leucyny (**37**) chloromrówczanem benzylu (**7**) w warunkach zasadowych, odpowiednio z wydajnościami 87 i 88% (Schemat 19).



Schemat 19. Synteza *N*-benzyloksykarbonylleucyny (*S*)-**38** i (*R*)-**38**.

6.3.2. Badania nad syntezą chiralnych izocyjanków

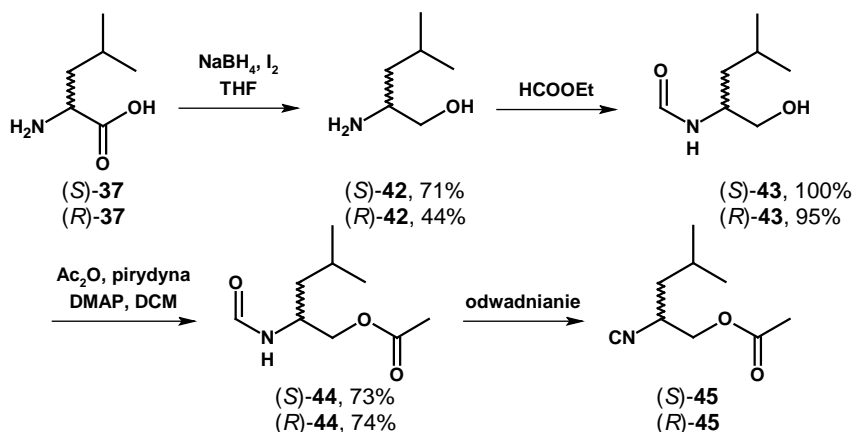
Istnieje kilka literaturowych doniesień na temat syntezy chiralnych, enancjomerycznie czystych izocyjanków otrzymywanych z α -aminokwasów. Najczęściej związki te mają strukturę α -podstawionych izocyjanooctanów. Metody syntezy tych izocyjanków przedstawione zostały w rozdziale 2.1.4. części literaturowej pracy. Analogicznie do syntezy izocyjanku **59** (Cz. lit.) otrzymanego z (*S*)-fenyloalaniny przeprowadzono syntezę izocyjanku (*S*)-**41** z (*S*)-leucyny (**37**) (Schemat 20). W pierwszym etapie na drodze estryfikacji otrzymano chlorowoderek estru metylowego (*S*)-leucyny (**39**). Następnie w reakcji formylowania grupy aminowej ortomrówczanem etylu otrzymano formylową pochodną (*S*)-**40** w postaci optycznie czystej. Izocyjanek (*S*)-**41** otrzymano poprzez odwadnianie pochodnej formylowej z zastosowaniem difosgeny, jednego z czynników najczęściej stosowanych do otrzymywania



Schemat 20. Synteza chiralnego izocyjanku (*S*)-**41**.

chiralnych izocyjanków (Schemat 20). Produkt otrzymano w formie optycznie czynnej, jednakże bezpośrednio określenie jego czystości optycznej nie było możliwe z powodu braku możliwości korelacji danych analitycznych z dostępnymi danymi literaturowymi. Korelacja możliwa była natomiast poprzez ponowne przeprowadzenie izocyjanku w znaną literaturowo pochodną formylową (*S*)-**40**, oraz określenie czystości optycznej na podstawie porównania z opublikowanymi danymi analitycznymi.¹⁶⁵ W wyniku hydrolizy izocyjanku (*S*)-**41** otrzymano związek (*S*)-**40** o czystości optycznej równej 24%. Wskazuje to na częściową racemizację, występującą bądź na etapie otrzymywania izocyjanku, bądź w reakcji jego hydrolizy. Zgodnie z literaturowymi doniesieniami można stwierdzić, że problem może wynikać z zastosowania metody odwadniania powodującej racemizację, bądź z samej struktury izocyjanku. Związek ten jest podatny na racemizację w związku z obecnością w sąsiedztwie centrum stereogenicznego dwóch elektronoakceptorowych grup ułatwiających proces racemizacji. Dodatkowo w związkach tego typu pojawia się ryzyko związane z dalszą racemizacją na etapie reakcji Ugięgo, co powodowałoby powstawanie skomplikowanych mieszanin diastereoizomerycznych produktów.

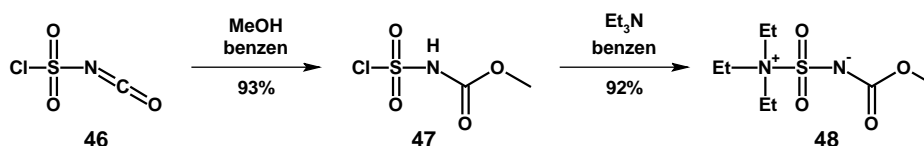
Ponieważ napotkano na wyżej opisane problemy związane z otrzymywaniem izocyjanku (*S*)-**41**, konieczne było opracowanie nowej, enancjomerycznie stabilnej struktury izocyjanku oraz metody jego otrzymywania. Wzoruując się na strukturze octanu 2-izocyjanoetylu (**5d**) z powodzeniem stosowanego w modelowej syntezie tripeptydów z C-kończącą grupą aldehydową zaprojektowano analogiczną strukturę oraz metodę otrzymywania pochodnej leucynowej **45**. W pierwszej kolejności skupiono się na opracowaniu metody syntezy enancjomeru *S* izocyjanku **45** wychodząc z leucyny o naturalnej konfiguracji na centrum stereogenicznym ((*S*)-**37**). W pierwszym etapie zredukowano grupę karboksylową w leucynie przy zastosowaniu diboranu (B_2H_6) generowanego *in situ* z borowodorku sodu poprzez utlenienie jodem. W ten sposób otrzymano (*S*)-leucynol ((*S*)-**42**) z wydajnością 55%. Produkt redukcji poddano *N*-formylowaniu mrówczanem etylu do pochodnej (*S*)-**43** z wydajnością ilościową, a następnie *O*-acylowaniu bezwodnikiem



Schemat 21. Synteza chiralnych izocyjanków (*S*)- i (*R*)-45.

octowym z wydajnością 73%. Ostatnim etapem syntezy był proces odwadniania grupy formamidowej prowadzący do otrzymania izocyjanku (*S*)-45 (Schemat 21). W celu określenia optymalnych warunków tej reakcji zastosowano pięć metod z użyciem różnych środków odwadniających.

Jednym z zastosowanych środków odwadniających był reagent Burgessa (48). Procesy odwadniania grupy formamidowej z zastosowaniem tego środka charakteryzuje przebieg w łagodnych warunkach, bez konieczności znacznego obniżania temperatury reakcji. Otrzymano go w dwuetapowym procesie. W pierwszym etapie w reakcji izocyjanianu chlorosulfonylu (46) z metanolem otrzymano karbaminian (47), który następnie w reakcji z trietyloaminą przeprowadzono w dipolarny reagent Burgessa (48) (Schemat 22).^{166,167}



Schemat 22. Synteza reagenta Burgessa.

Pozostałymi czynnikami odwadniającymi były: difosgen, tlenochlorek fosforu, chlorek tionylu oraz trifenylofosfina z czterochlorkiem węgla. Wydajności reakcji oraz skręcalności właściwe wydzielonych produktów przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Warunki i wyniki reakcji odwadniania formylowej pochodnej (*S*)-44 do izocyjanku (*S*)-45.

L.p.	Reagenty i warunki	Czas [godz.]	Wydajność [%]	$[\alpha]_D^{25}$
1	difosgen, NMM, DCM, -40 °C	2,0	31	+1,30
2	reagent Burgessa, DCM, temp. pok.	3,5	54	+5,08
3	POCl ₃ , TEA, THF, <5 °C	3,0	86	+5,05
4	SOCl ₂ , DMF, -30 °C	1,0	71	+4,59
5	PPh ₃ , CCl ₄ , TEA, DCM, reflux	3,0	57	+7,30

Produkt o najwyższej wartości skręcalności właściwej otrzymano przy zastosowaniu układu trifenylofosfiny z czterochlorkiem węgla jako środka odwadniającego (L.p. 5, Tabela 4). Niższymi ale zbliżonymi do siebie wartościami skręcalności właściwej charakteryzowały się produkty otrzymane poprzez odwadnianie reagentem Burgessa, tlenochlorkiem fosforu oraz chlorkiem tionylu. Produkt z najniższą wartością skręcalności właściwej otrzymano w reakcji z difosgenem. Jednocześnie izocyjanek (*S*)-**45** otrzymano z najwyższą wydajnością 86% w procesie odwadniania z zastosowaniem tlenochlorku fosforu.

Opracowaną metodę syntezy izocyjanu (*S*)-**45** zastosowano do otrzymania enancjomeru tego związku (*R*)-**45** (Schemat 21). Produkty poszczególnych etapów wydzielono z wydajnościami zbliżonymi do wartości dla enancjomerów (*S*). Izocyjanek otrzymano w reakcji odwadniania układem PPh₃, CCl₄ z wydajnością 65%, a skręcalność właściwa produktu miała wartość $[\alpha]_D^{25} = -7,15$.

Zbadano również stabilność enancjomeryczną otrzymanych izocyjanów w warunkach przechowywania (-20 °C) poprzez powtórzenie pomiarów skręcalności właściwej po okresie 4 miesięcy. Stwierdzono niewielki spadek czynności optycznej rzędu 0,5% na miesiąc. Wskazuje to na względnie wysoką stabilność tych związków w warunkach przechowywania.

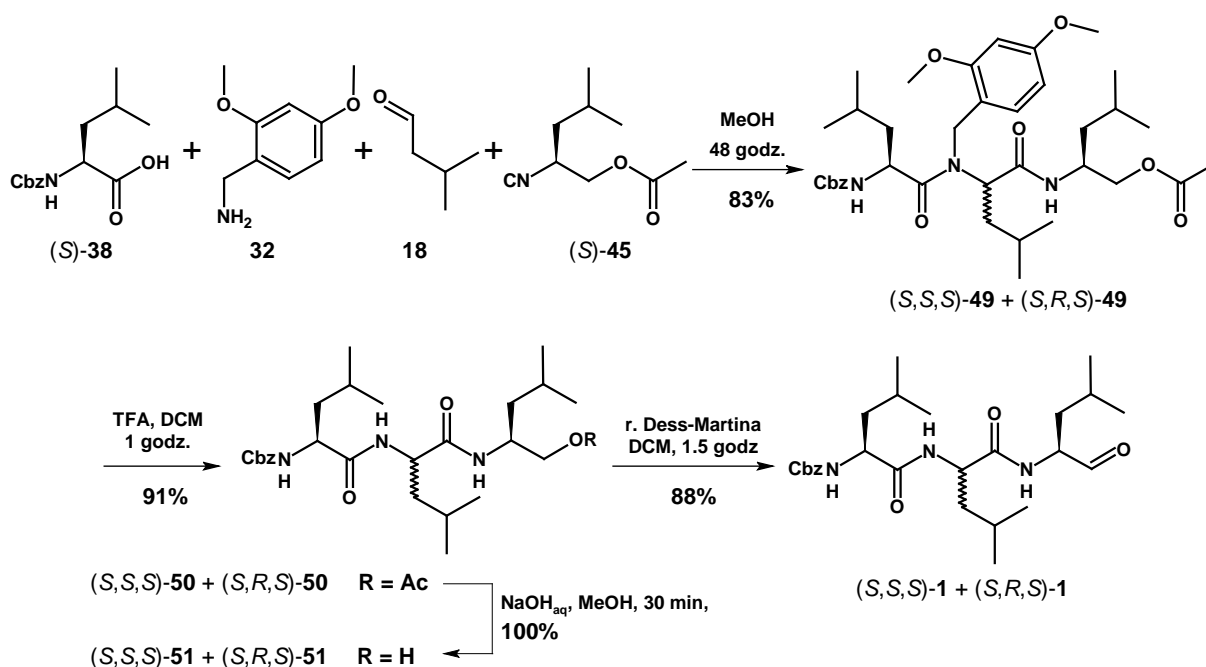
Pomimo wyznaczenia wartości skręcalności właściwej nie można było określić czystości enancjomerycznej otrzymanych izocyjanów (*S*)- i (*R*)-**45** z powodu braku literaturowych doniesień na temat tych związków. Problem ten rozwiązano w dalszej części pracy poprzez analizę składu mieszanin diastereoizomerycznych produktów reakcji Ugiego otrzymanych z zastosowaniem tych izocyjanów.

6.4. Badania nad syntezą Cbz-Leu-Leu-Leu-al w reakcji Ugiego z zastosowaniem chiralnych substratów

Celem tego etapu pracy była synteza wszystkich stereoizomerów aldehydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al (**1**) z zastosowaniem opracowanej metodologii otrzymywania tripeptydów z C-końcową grupą aldehydową. Założeniem było również wydzielenie każdego ze stereoizomerów produktów docelowych w postaci diastereoizomerycznie czystej. W związku z tym kolejnym problemem pojawiającym się w tej części pracy była konieczność opracowania metody rozdziału mieszanin diastereoizomerycznych produktów reakcji Ugiego.

6.4.1. Badania nad zastosowaniem reakcji Ugiego do syntezy inhibitora proteasomów MG-132 ((*S,S,S*)-1) oraz jego epimeru (*S,R,S*)-1

Zgodnie z mechanizmem reakcji Ugiego przy zastosowaniu chiralnych, enancjomerycznie czystych substratów produkty powstają jako mieszanina diastereoizomerów różniących się konfiguracją absolutną na nowopowstałym centrum stereogenicznym. Przy zastosowaniu reagentów, które nie ulegają racemizacji w warunkach reakcji, mieszanina produktów powinna składać się tylko z dwóch diastereoizomerów. Zastosowanie do reakcji Ugiego reagentów kwasowych oraz izocyjankowych o naturalnej konfiguracji (*S*) powinno więc prowadzić do otrzymania produktów w postaci mieszaniny diastereoizomerów o konfiguracji (*S,S,S*) oraz (*S,R,S*). Dlatego też do syntezy prowadzonej zgodnie z opracowaną ogólną metodologią otrzymywania tripeptydów z C-końcową grupą aldehydową zastosowano (*S*)-*N*-benzyloksykarbonyloleucynę ((*S*)-38) oraz izocyjanek (*S*)-45. Jako pozostałe reagenty użyto 2,4-dimetoksybenzyloaminę (32) oraz aldehyd izowalerianowy (18) wprowadzający do struktury produktu reakcji multikomponentowej trzeci łańcuch boczny leucyny. W reakcji Ugiego otrzymano mieszaninę produktów (*S,S,S*)-49 oraz (*S,R,S*)-49, którą wydzielono z wydajnością 83% (Schemat 23). Kolejne reakcje prowadzono bez rozdzielania składników mieszanin diastereoizomerycznych. Produkt reakcji Ugiego poddano reakcji odbezpieczenia wiązania amidowego z zastosowaniem TFA. Otrzymano mieszaninę tripeptydów (*S,S,S*)-50 oraz (*S,R,S*)-50 z wysoką wydajnością 91%. Następnie mieszaninę poddano reakcji hydrolizy prowadzącą do alkoholi (*S,S,S*)-51 oraz (*S,R,S*)-51,

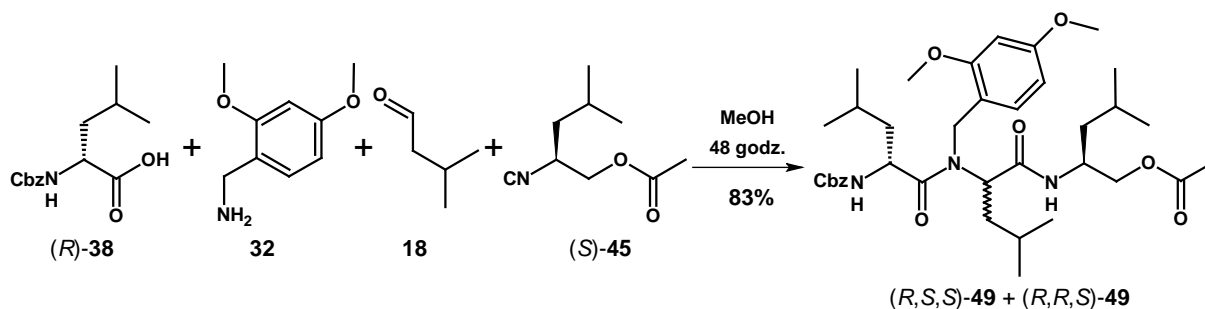


Schemat 23. Synteza stereoisomerów (*S,S,S*) i (*S,R,S*) tripeptydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al. (1).

które w ostatnim etapie utleniono do aldehydów (*S,S,S*)-**1** (MG-132) oraz (*S,R,S*)-**1** z wydajnością 88%. Widać zatem, że opracowaną metodologię można z powodzeniem wykorzystać do syntezy tripeptydów z zastosowaniem chiralnych reagentów. Wszystkie etapy syntezy charakteryzują się wysoką wydajnością przekraczającą 80% (Schemat 23).¹⁶⁸

Kolejnym problemem do rozwiązania było określenie składu mieszanin diastereoizomerycznych produktów powstających w reakcji Ugięgo oraz w kolejnych etapach syntezy. Nie można bowiem wykluczyć epimeryzacji na którymś z centrów stereogenicznych. Przy zastosowaniu najprostszej metody określającej skład mieszaniny, a mianowicie chromatografii cienkowarstwowej (TLC), w mieszaninie produktów reakcji Ugięgo (*S,S,S*)-**49** oraz (*S,R,S*)-**49** wykazano obecność dwóch sygnałów o zbliżonej intensywności, różniących się wyraźnie wskaźnikiem opóźnienia (R_f – ang. retardation factor). Wskazuje to na obecność w mieszaninie co najmniej dwóch diastereoizomerów różniących się od siebie polarnością. Na podstawie tych wyników nie można jednak wykluczyć obecności innych diastereoizomerów, których polarność może być zbliżona do polarności głównych produktów, w związku z czym sygnały pochodzące od nich nakrywałyby się na siebie. Do precyzyjnego określenia składu mieszanin wykorzystano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC). Wykazała ona obecność w mieszaninie dwóch produktów w proporcji zbliżonej do równomolowej wynoszącej 49,2 / 50,8. Ponieważ przypisanie konfiguracji absolutnej do poszczególnych diastereoizomerów nie było możliwe, w pierwszej kolejności podawane są wartości odpowiadające wynikom analiz bardziej polarnych diastereoizomerów.

W celu wykluczenia lub potwierdzenia powstawania produktów ubocznych tworzonych w wyniku racemizacji któregoś z reagentów przeprowadzono analogiczną reakcję Ugięgo z zastosowaniem reagenta kwasowego o przeciwnej konfiguracji absolutnej czyli kwasu (*R*)-**38** (Schemat 24). Produktem reakcji była mieszanina związków (*R,S,S*)-**49** oraz (*R,R,S*)-**49** wydzielona z wydajnością 80%. Skład mieszaniny kontrolowano podczas reakcji z zastosowaniem TLC. Z analizy wynikało, że produkty również tworzą się jako mieszanina



Schemat 24. Synteza mieszaniny diastereoizomerów (*R,S,S*)-**49** oraz (*R,R,S*)-**49** w reakcji Ugięgo.

związków różniących się polarnością. Różnica ta nie była jednak na tyle wyraźna jak w przypadku poprzednich diastereoizomerów. Analiza HPLC również wykazała obecność tylko dwóch diastereoizomerów produktów w również zbliżonej do równomolowej proporcji wynoszącej 51,4 / 48,6.

Ostatecznie skład obydwu mieszanin potwierdzono poprzez zmieszanie ich zawartości oraz wykonanie analizy składu z zastosowaniem HPLC. Wykazano obecność czterech wyraźnie oddzielnych sygnałów pochodzących od różnych związków. Wskazuje to na obecność w każdej z mieszanin tylko dwóch składników.

Wynik ten jest kluczowy do rozwiązania kilku zagadnień. Wyklucza on występowanie zjawiska racemizacji zarówno reagenta kwasowego jak i izocyjankowego. W przypadku racemizacji reagenta kwasowego w mieszaninie związków (*S,S,S*)-**49** oraz (*S,R,S*)-**49** występowałyby bowiem śladowe ilości diastereoizomerów (*R,S,S*)-**49** oraz (*R,R,S*)-**49**. Obecności ich nie stwierdzono przy zastosowaniu analizy HPLC. Z kolei racemizację reagenta izocyjankowego można wykluczyć ponieważ w wyniku występowania tego procesu produktami reakcji Ugiego byłyby również diastereoizomery (*S,S,R*)-**49** oraz (*S,R,R*)-**49**, będące enancjomerami otrzymanych już diastereoizomerów (*R,R,S*)-**49** oraz (*R,S,S*)-**49**. Czasy retencji tych związków powinny zatem odpowiadać czasom retencji ich enancjomerów zgodnie z zasadą identycznych właściwości chemicznych enancjomerów. Brak tych sygnałów w obydwu mieszaninach wyklucza więc występowanie racemizacji izocyjanków.

Ponadto powstawanie w reakcji Ugiego mieszanin składających się wyłącznie z dwóch diastereoizomerów potwierdza wysoką czystość enancjomeryczną otrzymanych izocyjanków (*S*)-**45** oraz (*R*)-**45**. Ponieważ bezpośrednio określenie czystości optycznej tych izocyjanków nie było możliwe, na tym etapie potwierdzono również, że w warunkach odwadniania pochodnej formylowej z zastosowaniem trifenylofosfiny oraz czterochlorku węgla racemizacja nie następuje.

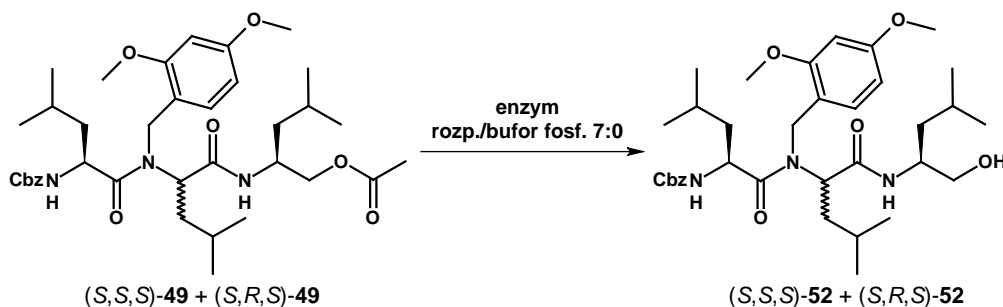
Problemem dotąd nierozwiązanym pozostaje rozdział diastereoizomerycznych mieszanin produktów. Rozwiązanie tego problemu jest niezbędne do otrzymania wszystkich stereoizomerów związków docelowych w formie czystej. W pierwszej kolejności podjęto próby wykorzystania enzymów do rozdziału otrzymanych związków.

6.4.2. Badania nad enzymatycznym rozdziałem mieszanin diastereoizomerycznych produktów reakcji Ugiego

Enzymy znajdują coraz szersze zastosowanie w syntezie organicznej. Obniżają one energię aktywacji poszczególnych reakcji i poprzez modyfikację kinetyki tych reakcji przyspieszają ich szybkość. Szczególnie duże znaczenie enzymy mają w reakcjach kinetycznego rozdziału mieszanin enancjomerów lub diastereoizomerów. Aby procesy rozdziału tego typu były efektywne enzym powinien przyspieszać reakcję tylko jednego ze stereoizomerów.

Otrzymane produkty reakcji Ugiego o strukturze **49** posiadają ugrupowanie estrowe w postaci octanu alkoholu. Rozdział tych związków powinien być zatem możliwy na drodze diastereoselektywnej reakcji hydrolizy wiązania estrowego z zastosowaniem enzymów hydrolitycznych takich jak lipazy oraz esterazy.

W reakcji modelowej mieszaninę tripeptydów (*S,S,S*)-**49** oraz (*S,R,S*)-**49** poddano reakcji hydrolizy do alkoholi (*S,S,S*)-**52** oraz (*S,R,S*)-**52** (Schemat 25). W pierwszej kolejności



Schemat 25. Kinetyczny rozdział enzymatyczny mieszaniny (*S,S,S*)-**48** oraz (*S,R,S*)-**48**.

przeprowadzono przegląd enzymów pod kątem aktywności hydrolitycznej względem tych związków. Sprawdzono dwanaście preparatów enzymatycznych w postaci proszków acetonowych otrzymanych z tkanek zwierzęcych: (a) z wątrób: świnięcej, jagnięcej, cielęcej, kaczej, gęsiej, dziczej, jeleniej, indyczej, króliczej oraz bydlęcej; (b) z nerek: świńskiej i bydlęcej. Zbadano również komercyjne lipazy wydzielone z kielków pszenicy, trzustki wieprzowej, bakterii: *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Chromobacterium viscosum* i preparatu Amano AK oraz grzybów *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium roqueforti* oraz preparatu Novozym 435 z *Candida antarctica*. Reakcje prowadzono w układzie aceton/bufor fosforanowy (pH = 7,0), 2:8. Przebieg reakcji kontrolowano z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej. Produkty obserwowano w reakcjach katalizowanych przez proszki acetonowe z wątroby świńskiej, króliczej oraz indyczej, a także przez lipazy z kielków pszenicy, *Candida cylindracea*,

Pennicylium roqueforti oraz *Rhizomucor miehei*. Produkt o najwyższym stężeniu w mieszaninie reakcyjnej osiągnięto z zastosowaniem lipazy z kielków pszenicy. W przypadku pozostałych enzymów produkt obserwowano w ilościach śladowych.

W kolejnym etapie zbadano wpływ rodzaju rozpuszczalnika oraz jego zawartości w mieszaninie reakcyjnej na przebieg reakcji katalizowanej lipazą z kielków pszenicy. Sprawdzone następujące rozpuszczalniki: aceton, Et₂O, *i*-Pr₂O, *n*-Bu₂O, eter *tert*-butylowometylowy, cykloheksanon, DMF, THF, toluen, DMSO, metanol oraz etanol. Na tym etapie przebieg reakcji oraz skład wydzielonych mieszanin produktów kontrolowano z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Reakcje najwydajniej przebiegały w metanolu, DMSO oraz acetonie. Pomimo wysokiej wydajności reakcji prowadzonej w metanolu (83%) proporcja produktów była równa 80:20 i odpowiadała niewysokiej wartości nadmiaru diastereoizomerycznego d.e. = 60% (d.e. = 100% · (P1 – P2), gdzie wartości P1 i P2 odpowiadają względnej zawartości poszczególnych produktów i spełniają równanie: P1 + P2 = 1). W reakcji z zastosowaniem DMSO produkty wydzielono z wydajnością 52%. Niestety wyniki analizy składu mieszaniny produktów wykazały ponownie niezbyt wysoki nadmiar jednego z produktów (d.e. = 76%). W reakcji prowadzonej w acetonie wydzielono mieszaninę o wysokim nadmiarze d.e. = 90%. Wydajność tej reakcji była jednak bardzo niska (17%).

Tabela 5. Wyniki kinetycznego rozdziału diastereoizomerów (*S,S,S*)-**49** oraz (*S,R,S*)-**49** w różnych rozpuszczalnikach z zastosowaniem lipazy z kielków pszenicy.

L.p.	Rozpuszczalnik	Wydajność [%]	d.r.	d.e. [%]
1	metanol	83	80 : 20	60
2	DMSO	52	88 : 12	76
3	aceton	17	95 : 5	90

Analizując te wyniki trudno jest jednoznacznie wskazać rozpuszczalnik odpowiedni do zastosowania w reakcji enzymatycznej hydrolizy estrów (*S,S,S*)-**49** oraz (*S,R,S*)-**49**. Wysoka wydajność reakcji wiąże się bowiem z wydzieleniem produktów z niskim nadmiarem diastereoizomerycznym. I na odwrót. Reakcje, w których otrzymuje się mieszaniny produktów występujących z dużym nadmiarem charakteryzują się niskimi wydajnościami.

Niska selektywność tej reakcji mogła być spowodowana oddaleniem najbliższego centrum stereogenicznego o dwa atomy od miejsca, w którym następuje reakcja hydrolizy. Ponadto związki (*S,S,S*)-**49** oraz (*S,R,S*)-**49** są estrami alkoholi pierwszorzędowych. Natomiast najlepsze rezultaty rozdziału z zastosowaniem enzymów hydrolitycznych obserwuje się w przypadku substratów w postaci estrów alkoholi drugorzędowych z centrum stereogenicznym występującym na węglu α tych alkoholi.¹⁴²

Ponieważ rozdział mieszanin diastereoizomerów z zastosowaniem metod enzymatycznych był nieefektywny problem ten postanowiono rozwiązać z użyciem metod fizycznych.

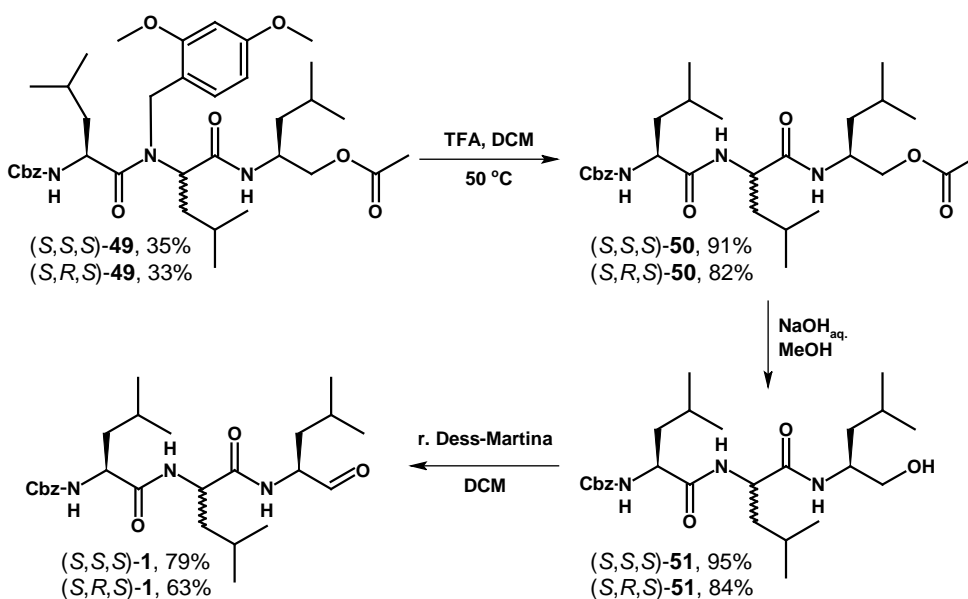
6.4.3. Badania nad rozdziałem mieszanin diastereoizomerycznych produktów reakcji Ugiego z zastosowaniem metod chromatograficznych oraz synteza wszystkich stereoizomerów aldehydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al

W tej części pracy badano możliwość zastosowania metod chromatograficznych do rozdziału mieszanin produktów reakcji Ugiego. Ponieważ na podstawie analizy składu mieszanin z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej stwierdzono, że poszczególne diastereoizomery różnią się od siebie polarnością, do rozdziału składników postanowiono wykorzystać żelową chromatografię kolumnową. Metoda ta służy do rozdziału składników mieszaniny na podstawie ich zróżnicowanego powinowactwa do stosowanej fazy stałej i ruchomej. Do rozdziału zastosowano jako fazę stałą, żel krzemionkowy o drobnych ziarnach (wysokiej zdolności rozdzielczej) w trzydziestokrotnym nadmiarze wagowym w stosunku rozdzielanej mieszaniny. Rozdział prowadzono metodą gradientową z zastosowaniem układu heksan/octan etylu jako fazy ciekłej.

W przypadku rozdziału mieszaniny związków (*S,S,S*)-**49** oraz (*S,R,S*)-**49**, charakteryzujących się dużą różnicą polarności dobre efekty osiągnięto po przeprowadzeniu trzech powtarzanych procesów chromatograficznych. W każdym z nich otrzymano dwie frakcje diastereoizomerycznie czystych związków oraz nierozdzieloną mieszaninę, którą poddawano kolejnemu rozdziałowi. W ten sposób wydzielono dwa czyste (>95%, HPLC) diastereoizomery z wydajnościami 35 i 33% liczonymi jako wydajności reakcji Ugiego. Opracowana metoda jest z pewnością mniej dokładna i mniej wydajna niż metody rozdziału z zastosowaniem preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Zaletą tej metody jest jednak nieporównywalnie niższy koszt procesu oraz możliwość rozdziału większych ilości próbek.

Rozwiązanie problemu rozdziału tych diastereoizomerów umożliwiło przeprowadzenie syntezy dwóch z ośmiu docelowych aldehydów Cbz-Leu-Leu-Leu-al o konfiguracji (*S,S,S*) oraz (*S,R,S*) w postaci czystej. Sposób przypisania konfiguracji absolutnych do każdego ze związków opisany jest w kolejnym akapicie. Syntezę przeprowadzono zgodnie z opracowaną wcześniej metodologią. W reakcji usunięcia grupy

Dmb ze związków (*S,S,S*)-**49** oraz (*S,R,S*)-**49** z zastosowaniem kwasu trifluorootowego otrzymano produkty (*S,S,S*)-**50** oraz (*S,R,S*)-**50** z bardzo wysokimi wydajnościami, wynoszącymi odpowiednio 100 i 91%. Następnie w reakcji hydrolizy otrzymano alkohole (*S,S,S*)-**51** oraz (*S,R,S*)-**51**, z wydajnościami 100 i 93%, które w ostatnim etapie utleniono z zastosowaniem reagenta Dess-Martina do aldehydów (*S,S,S*)-**1** oraz (*S,R,S*)-**1**, odpowiednio z wydajnościami 79 i 63%. W ten sposób otrzymano znany literaturowo związek MG-132 oraz jego epimer różniący się konfiguracją absolutną na środkowym centrum stereogenicznym (Schemat 26).



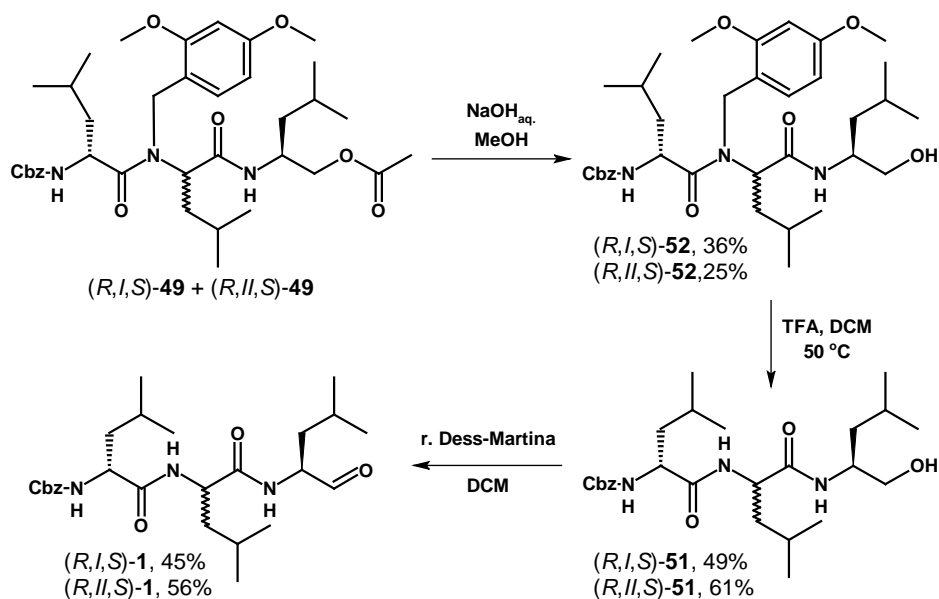
Schemat 26. Synteza tripeptydów (*S,S,S*)-**1** oraz (*S,R,S*)-**1** w postaci diastereoizomerycznie czystej.

Pomimo prowadzonych licznych badań z zastosowaniem inhibitora MG-132, nie znane są żadne dokładne doniesienia opisujące spektroskopowe oraz optyczne właściwości tego związku. Nie możliwe więc było przypisanie konfiguracji poszczególnych produktów na podstawie porównania danych tego typu z danymi literaturowymi. Możliwe to było natomiast na drodze porównania właściwości fizykochemicznych otrzymanych produktów z właściwościami handlowo dostępnego inhibitora MG-132. Ponieważ poszczególne diastereoizomery aldehydów różnią się polarnością do przypisania struktur użyto metodę chromatografii cienkowarstwowej. Przez porównanie wartości wskaźnika opóźnienia - R_f stwierdzono jednoznacznie, że otrzymanym diastereoizomerem (*S,S,S*)-**1** jest związek mniej polarny. Dlatego też poprzez analogię konfiguracje absolutne zostały przypisane automatycznie do wszystkich produktów poszczególnych etapów syntezy.

Po opracowaniu metody syntezy diastereoizomerów (*S,S,S*)-**1** oraz (*S,R,S*)-**1** można było z jej zastosowaniem przeprowadzić syntezę enancjomerów tych związków czyli

(*R,R,R*)-**1** oraz (*R,S,R*)-**1**. Szkielety tripeptydowe otrzymano w reakcji Ugiiego z zastosowaniem (*R*)-*N*-benzyloksykarbonyloleucyny ((*R*)-**38**), 2,4-dimetoksybenzyloaminy (**32**), aldehydu izowalerianowego (**18**) oraz izocyjanku (*R*)-**45**. W reakcji otrzymano mieszaninę produktów (*R,R,R*)-**50** oraz (*R,S,R*)-**50** z wydajnością 79%. Diastereoizomery w postaci czystej wydzielono odpowiednio z wydajnościami 32 i 31%. Na drodze dalszej funkcjonalizacji otrzymano aldehydy (*R,R,R*)-**1** oraz (*R,S,R*)-**1** z wydajnościami zbliżonymi do wydajności otrzymanych w syntezie enancjomerów tych związków. W ten sposób otrzymano kolejne dwa spośród ośmiu stereoisomerów tripeptydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al.

W przypadku dwóch pozostałych par diastereoizomerów należało wyżej opisaną metodę zmodyfikować. Bezpośredni rozdział wcześniej otrzymanej w reakcji Ugiiego mieszaniny produktów (*R,S,S*)-**49** oraz (*R,R,S*)-**49** (Schemat 20) z zastosowaniem chromatografii kolumnowej był niemożliwy z powodu zbyt małej różnicy polarności tych związków. Niestety na drodze usunięcia grupy Dmb, hydrolizy grupy estrowej oraz utlenienia grupy alkoholowej również nie otrzymano związków, których rozdział z wykorzystaniem różnicy ich polarności byłby możliwy. Zmieniono więc kolejność reakcji. Jako pierwszą przeprowadzono hydrolizę wiązania estrowego otrzymując mieszaninę alkoholi (*R,I,S*)-**52** oraz (*R,II,S*)-**52** z wydajnością 95% (Schemat 27). Różnica polarności otrzymanych diastereoizomerów alkoholi była wystarczająco duża, aby rozdział tych związków był możliwy z zastosowaniem chromatografii kolumnowej. Ponownie w trzykrotnie powtórzonym procesie rozdzielono alkohole na składniki (*R,I,S*)-**52** oraz (*R,II,S*)-**52** odpowiednio z wydajnością 36 i 25%. Niestety, przypisanie konfiguracji poszczególnym składnikom mieszaniny produktów oraz związkom otrzymanym w wyniku ich dalszej funkcjonalizacji nie było możliwe. Poszczególne diastereoizomery oznaczano zatem poprzez umowny zapis (*R,I,S*) oraz (*R,II,S*) przypisany odpowiednio do związku mniej oraz bardziej polarnego w parze. Następnie każdy z wydzielonych diastereoizomerów poddano reakcji usunięcia grupy Dmb otrzymując alkohole (*R,I,S*)-**51** oraz (*R,II,S*)-**51** odpowiednio z wydajnościami 49 i 61%. Wydajności tych reakcji były niższe niż w przypadku reakcji odbezpieczania estrów (*S,S,S*)-**49** oraz (*S,R,S*)-**49** ponieważ w reakcjach tych obserwowano powstawanie produktów ubocznych, a ponadto proces wydzielenia produktów z mieszaniny reakcyjnej był utrudniony, co wynikało z zasadowego sposobu oczyszczania (odmycie kwasu trifluorooctowego), a jednocześnie kwasowego charakteru substratu (alkohol). Pomimo tych utrudnień związki te były na tyle hydrofobowe, że możliwe było ich wydzielenie w procesie ekstrakcji. W ostatnim etapie selektywnie utleniono grupę hydroksylową do aldehydowej i otrzymano diastereoizomery (*R,I,S*)-**1** oraz (*R,II,S*)-**1** odpowiednio z wydajnościami 45 i 56%.



Schemat 27. Synteza tripeptydów $(R,I,S)\text{-1}$ oraz $(R,II,S)\text{-1}$ w postaci diastereoizomerycznie czystej.

Zmodyfikowaną metodę zastosowano również do syntezy pozostałych dwóch diastereoizomerów aldehydów. W pierwszym etapie w reakcji Ugiego z zastosowaniem $(S)\text{-}N\text{-benzyloksykarbonyloleucyny}$ ($(S)\text{-38}$), 2,4-dimetoksybenzyloaminy ($\mathbf{32}$), aldehydu izowalerianowego ($\mathbf{18}$) oraz izocyjanku ($(R)\text{-45}$) otrzymano mieszaninę produktów $(S,I,R)\text{-49}$ oraz $(S,II,R)\text{-49}$ z wydajnością 82%. Proporcja składników wynosiła 51:49 co wskazuje na brak racemizacji izocyjanku ($(R)\text{-45}$) oraz tak samo jak w przypadku jego enancjomeru wysoką czystość enancjomeryczną. Kolejne etapy syntezy przeprowadzono w tej samej sekwencji co w przypadku syntezy związków $(R,I,S)\text{-1}$ oraz $(R,II,S)\text{-1}$ przedstawionej na Schemacie 23, a produkty poszczególnych etapów otrzymano ze zbliżonymi wydajnościami. Otrzymano więc ostatnie dwa aldehydy $(S,I,R)\text{-1}$ oraz $(S,II,R)\text{-1}$.

Czystość wszystkich produktów poszczególnych etapów syntezy określano przy pomocy wysokosprawnej chromatografii kolumnowej. Przekraczała ona wartość 95%. Ponadto dla wszystkich związków oznaczono czynność optyczną poprzez pomiar skręcalności właściwej. W Tabeli zestawiono wyniki pomiarów skręcalności właściwej wszystkich ośmiu otrzymanych aldehydów $\mathbf{1}$. Można wyraźnie zauważyć, że wartości skręcalności właściwej poszczególnych par enancjomerów są do siebie zbliżone, a różnią się tylko znakiem skręcalności.

Tabela 6. Wartości skręcalności właściwej wszystkich stereoizomerów aldehydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al (**1**).

Aldehyd	$[\alpha]_D^{25}$	Enancjomer
(<i>S,S,S</i>)- 1	+37,1	A
(<i>S,R,S</i>)- 1	-57,3	B
(<i>R,R,R</i>)- 1	-36,5	A'
(<i>R,S,R</i>)- 1	+55,5	B'
(<i>R,I,S</i>)- 1	+45,9	C
(<i>R,II,S</i>)- 1	-27,1	D
(<i>S,I,R</i>)- 1	-47,1	C'
(<i>S,II,R</i>)- 1	+29,0	D'

Podsumowując. Opracowano ogólną metodę otrzymywania tripeptydów z C-końcową grupą aldehydową z dowolną konfiguracją przestrzenną na centrach stereogenicznych. Metodologię tą zastosowano do syntezy wszystkich stereoizomerów aldehydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al. Tym samym zaprezentowano nową i szybką metodę syntezy znanego inhibitora proteasomów MG-132 ((*S,S,S*)-**1**) oraz dotąd nieznanymi a także niezbadanymi stereoizomerów tego związku. Zastosowanie tej metody ułatwia syntezę tripeptydów zbudowanych z aminokwasów o nienaturalnej konfiguracji. Dotychczas znanych było tylko kilka struktur zbudowanych z takich aminokwasów.

Przypisanie konfiguracji absolutnych wszystkich stereoizomerów produktów z zastosowaniem metody protonowego jądrowego rezonansu magnetycznego nie powiodło się. Na tym etapie nie podjęto dalszych prób określenia konfiguracji absolutnych tych związków.

6.5. Badania biologicznej aktywności stereoizomerów aldehydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al

Badania biologiczne opisane w tym rozdziale przeprowadzone były w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego przez zespół prof. dr. hab. med. Jakuba Gołąba.

Wszystkie otrzymane stereoizomery aldehydów Cbz-Leu-Leu-Leu-al zbadano pod kątem działania przeciwnowotworowego w procesie inhibicji aktywności chymotrypsynopodobnej (ChTL) proteasomów wyizolowanych z komórek szpiczaka mnogiego (J558L) oraz komórek raka piersi (EMT6). Badano aktywność proteasomów po 15, 30 oraz 60 minutach od dodania do próbki aldehydu stosując aktywność proteasomu w DMSO bez dodatku aldehydu jako aktywność odniesienia (100%) (Tabela 7 i Tabela 8). Wykazano, że zdolność wysokiej inhibicji posiadał handlowy inhibitor MG-132 oraz stereoizomer (*S,R,S*)-**1**, który wykazał najwyższą aktywność w przypadku inhibicji proteasomów zarówno w komórkach szpiczaka mnogiego jak i w komórkach raka piersi.

Pozostałe stereoisomery aldehydu **1** powodowały nieznaczną inhibicję lub aktywację chymotrypsynopodobnej aktywności proteasomów. Przy stężeniu 1000 nM również stereoisomer (*R,II,S*)-**1** powodował znaczną inhibicję proteasomów w komórkach szpiczaka mnogiego (Tabela 7), natomiast stereoisomer (*S,S,S*)-**1** hamował aktywność proteasomów w komórkach raka piersi (Tabela 8).

Tabela 7. Wpływ MG-132 i jego stereoisomerów na chymotrypsynopodobną aktywność proteasomów w komórkach szpiczaka mnogiego (J558L).

aldehyd	aktywność proteasomu przy stężeniu aldehydu 100 nM ^a			aktywność proteasomu przy stężeniu aldehydu 1000 nM ^a		
	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min
DMSO ^b	100 ± 5	100 ± 3	100 ± 2	100 ± 5	100 ± 3	100 ± 2
(<i>R,I,S</i>)- 1	115 ± 3	118 ± 2	123 ± 2	114 ± 3	117 ± 2	121 ± 3
(<i>S,II,R</i>)- 1	104 ± 2	105 ± 3	107 ± 5	107 ± 3	106 ± 3	106 ± 3
(<i>R,S,R</i>)- 1	100 ± 5	110 ± 2	112 ± 1	102 ± 2	96 ± 8	99 ± 3
(<i>S,I,R</i>)- 1	92 ± 3	93 ± 1	94 ± 2	55 ± 3	64 ± 3	77 ± 4
(<i>R,R,R</i>)- 1	87 ± 2	89 ± 2	89 ± 1	58 ± 2	66 ± 2	71 ± 3
(<i>S,S,S</i>)- 1	84 ± 3	91 ± 3	95 ± 5	71 ± 4	72 ± 2	74 ± 3
(<i>R,II,S</i>)- 1	71 ± 2	77 ± 2	82 ± 2	30 ± 1	40 ± 2	53 ± 4
(<i>S,R,S</i>)- 1	25 ± 2	36 ± 2	50 ± 2	11 ± 0	21 ± 1	38 ± 2
MG-132	32 ± 3	44 ± 4	60 ± 5	15 ± 0	25 ± 1	44 ± 3

Tabela 8. Wpływ MG-132 i jego stereoisomerów na chymotrypsynopodobną aktywność proteasomów w komórkach raka piersi (EMT6).

aldehyd	aktywność proteasomu przy stężeniu aldehydu 100 nM ^a			aktywność proteasomu przy stężeniu aldehydu 1000 nM ^a		
	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min
DMSO	100 ± 5	100 ± 4	100 ± 4	100 ± 5	100 ± 4	100 ± 4
(<i>R,I,S</i>)- 1	97 ± 1	95 ± 1	95 ± 1	104 ± 6	100 ± 5	99 ± 3
(<i>S,II,R</i>)- 1	110 ± 2	103 ± 1	99 ± 2	118 ± 10	111 ± 8	106 ± 7
(<i>S,I,R</i>)- 1	95 ± 1	91 ± 2	91 ± 2	44 ± 4	46 ± 4	53 ± 4
(<i>R,R,R</i>)- 1	90 ± 4	90 ± 3	91 ± 2	62 ± 3	70 ± 4	78 ± 6
(<i>S,S,S</i>)- 1	71 ± 3	77 ± 4	86 ± 5	29 ± 3	37 ± 2	50 ± 2
(<i>R,II,S</i>)- 1	87 ± 4	85 ± 5	84 ± 7	61 ± 3	61 ± 3	67 ± 3
(<i>S,R,S</i>)- 1	17 ± 4	22 ± 4	31 ± 4	5 ± 0	7 ± 0	13 ± 1
MG-132	20 ± 3	25 ± 3	35 ± 2	12 ± 1	14 ± 1	19 ± 1

W kolejnych badaniach biologicznych wszystkie otrzymane stereoizomery aldehydu **2** były badane pod kątem inhibicji chymotrypsynopodobnej (ChTL), trypsynopodobnej (TL) i peptydylo-glutamyłowej hydrolizującej peptydy (PGPH) aktywności oczyszczonego proteasomu 20S wyizolowanego z ludzkich erytrocytów. Bдания te wykazały, że tylko dwa spośród otrzymanych stereoizomerów ((*S,R,S*)-(-)-**1** i (*S,I,R*)-(-)-**1**) oraz komercyjny MG-132 hamowały aktywność ChTL proteasomu z wartością IC₅₀ niższą od 1 μM (Tabela 9). Aktywności TL i PGPH były inhibowane przy wyraźnie wyższych stężeniach, przy czym izomery (*S,R,S*)-(-)-**1** i (*S,I,R*)-(-)-**1** były bardziej selektywne niż MG-132.

Tabela 9. Wpływ MG-132 i jego stereoizomerów na ChTL, TL i PGPH aktywności oczyszczonych proteasomów 20S wydzielonych z ludzkich erytrocytów.

aldehyd	IC ₅₀ [μM]		
	ChTL	TL	PGPH
(<i>R,I,S</i>)-(+)- 1	>100	>100	>100
(<i>S,II,R</i>)-(+)- 1	>100	>100	>100
(<i>R,S,R</i>)-(+)- 1	>100	>100	>100
(<i>S,I,R</i>)-(-)- 1	0.97	91.33	22.82
(<i>R,R,R</i>)-(-)- 1	9.81	>100	11.29
(<i>S,S,S</i>)-(+)- 1	5.46	>100	>100
(<i>R,II,S</i>)-(-)- 1	1.79	>100	17.25
(<i>S,R,S</i>)-(-)- 1	0.22	34.4	2.95
MG-132	0.89	104.43	5.70

Analizując powyższe wyniki należy podkreślić wysoką aktywność stereoizomeru (*S,R,S*)-**1** jako inhibitora proteasomów. Aktywność poszczególnych stereoizomerów jest zależna od stopnia oczyszczenia badanych proteasomów oraz od rodzaju komórek z których pochodzą, jednakże wykazano, że izomer (*S,R,S*)-**1** jest najbardziej aktywnym inhibitorem w badanej grupie we wszystkich prowadzonych badaniach biologicznych. Tym samym tripeptyd o najwyższej aktywności posiada w swej strukturze aminokwas o nienaturalnej konfiguracji. Wyniki wskazują na możliwość zwiększenia aktywności związku poprzez zmianę konfiguracji na jednym z trzech centrów stereogenicznych. Wykazanie wysokiej aktywności związku (*S,R,S*)-**1**, a także niskiej pozostałych stereoizomerów wskazuje na duży wpływ budowy przestrzennej tripeptydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al na biologiczne właściwości tych związków.

6.6. Badania biologicznej aktywności związków otrzymanych w poszczególnych etapach syntezy

Badania opisane w tym rozdziale przeprowadzone były w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego przez zespół dr Izabeli Młynarczuk-Biały.

Badania prowadzone były na liniach komórkowych:

- NIH-3T3 – unieśmiertelnione mysie fibroblasty – najliczniejszy rodzaj komórek tkanki łącznej właściwej – wykazują prawidłowe funkcje w organizmie;
- RAS-3T3 – mysie fibroblasty transfekowane onkogenem RAS, w których kinaza RAS jest ciągle aktywna – wykazują właściwości nowotworowe.

Jako miarę aktywności poszczególnych związków stosowano współczynnik IC_{50} dla linii komórkowych NIH oraz RAS. Aby związek był aktywnym oraz selektywnym inhibitorem proteasomów powinien wpływać na komórki RAS-3T3 (wartości IC_{50} powinny być niskie) oraz nie powinien hamować aktywności proteasomów w komórkach NIH-3T3 (wartości IC_{50} powinny być wysokie).

Zbadano produkty poszczególnych etapów przedstawionej na Schemacie 19 syntezy mieszaniny tripeptydów (*S,S,S*)-**1** i (*S,R,S*)-**1** (Tabela 11). Wyniki wskazują na wysoką aktywność zarówno mieszaniny aldehydów Cbz-Leu-Leu-Leu-al **1** jak i produktów reakcji Ugięgo **49**, z tą różnicą, że aldehydy były bardziej selektywne oraz około 10 razy bardziej aktywne jako inhibitory proteasomów w komórkach nowotworowych RAS. Produkty reakcji odbezpieczania wiązania amidowego **50** oraz hydrolizy grupy estrowej nie wykazywały żadnej znaczącej aktywności (Tabela 10).

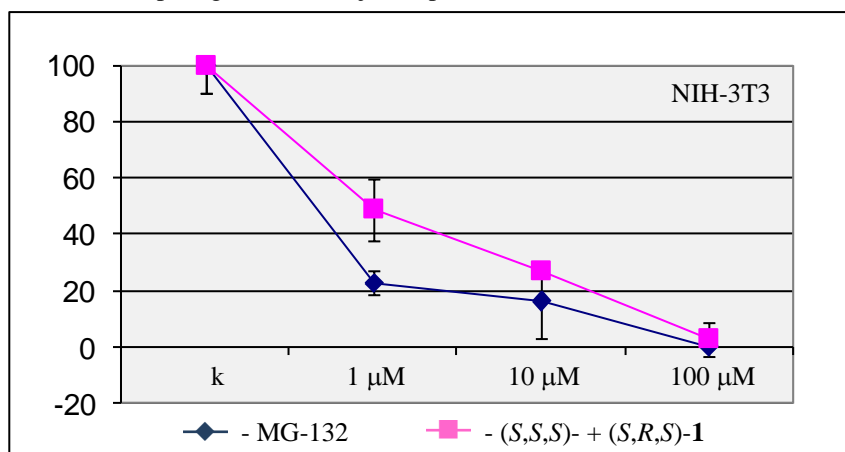
Tabela 10. Inhibicja aktywności proteasomów w komórkach NIH-3T3 i RAS-3T3 przez mieszaniny związków **49**, **50**, **51** i **1**.

L.p.	Badana mieszanina	IC_{50} [μ M]	
		NIH-3T3	RAS-3T3
1	(<i>S,S,S</i>)- + (<i>S,R,S</i>)- 49	4	5
2	(<i>S,S,S</i>)- + (<i>S,R,S</i>)- 50	>40	>40
3	(<i>S,S,S</i>)- + (<i>S,R,S</i>)- 51	>40	>40
4	(<i>S,S,S</i>)- + (<i>S,R,S</i>)- 1	2,5	0,6

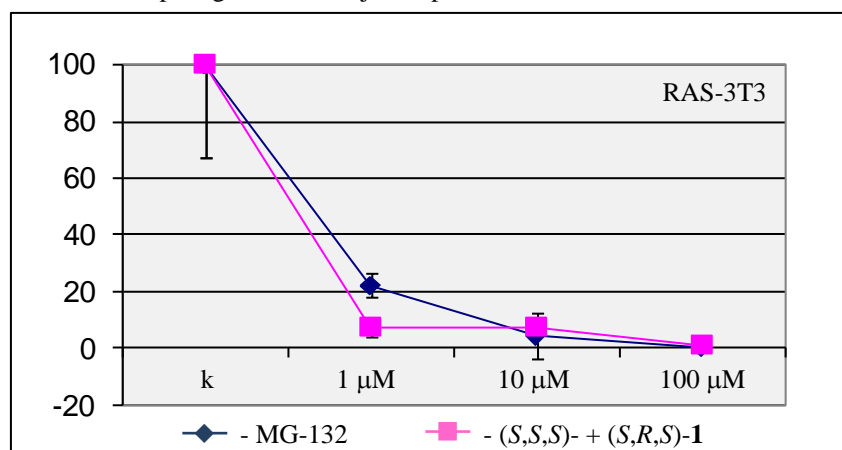
W kolejnych badaniach porównano aktywność komercyjnie dostępnego inhibitora MG-132 z otrzymaną mieszaniną tego związku (*S,S,S*)-**1** i jego epimeru (*S,R,S*)-**1**. Wykazano, że mieszanina epimerów w każdym ze stosowanych stężeń była mniej aktywna jako inhibitor proteasomów w komórkach zdrowych NIH-3T3 niż czysty MG-132 (Wykres 1). Natomiast w

przypadku badań inhibicji proteasomów w komórkach nowotworowych RAS-3T3 mieszanina epimerów wykazywała wyższą aktywność przy stężeniu 1 μM . W przypadku wyższych stężeń aktywność mieszaniny epimerów była porównywalna do aktywności handlowego MG-132 (Wykres 2). Wyniki te wskazują na wyższą aktywność oraz selektywność jednego ze składników mieszaniny. Ponieważ epimer (*S,S,S*)-**1** ma strukturę inhibitora MG-132 wskazuje to na wyższą aktywność drugiego składnika mieszaniny czyli epimeru (*S,R,S*)-**1**. Wyniki te wraz z wynikami przedstawionymi w Tabelach 7-10 potwierdzają zatem wyższą aktywność jako inhibitora proteasomów stereoizomeru (*S,R,S*)-**1** niż (*S,S,S*)-**1**.

Wykres 1. Wpływ MG-132 oraz mieszaniny (*S,S,S*)- i (*S,R,S*)-**1** na inhibicję aktywności proteasomu w komórkach NIH-3T3 po 1 godz. inkubacji; k – próba kontrolna bez dodatku inhibitora – 100%.



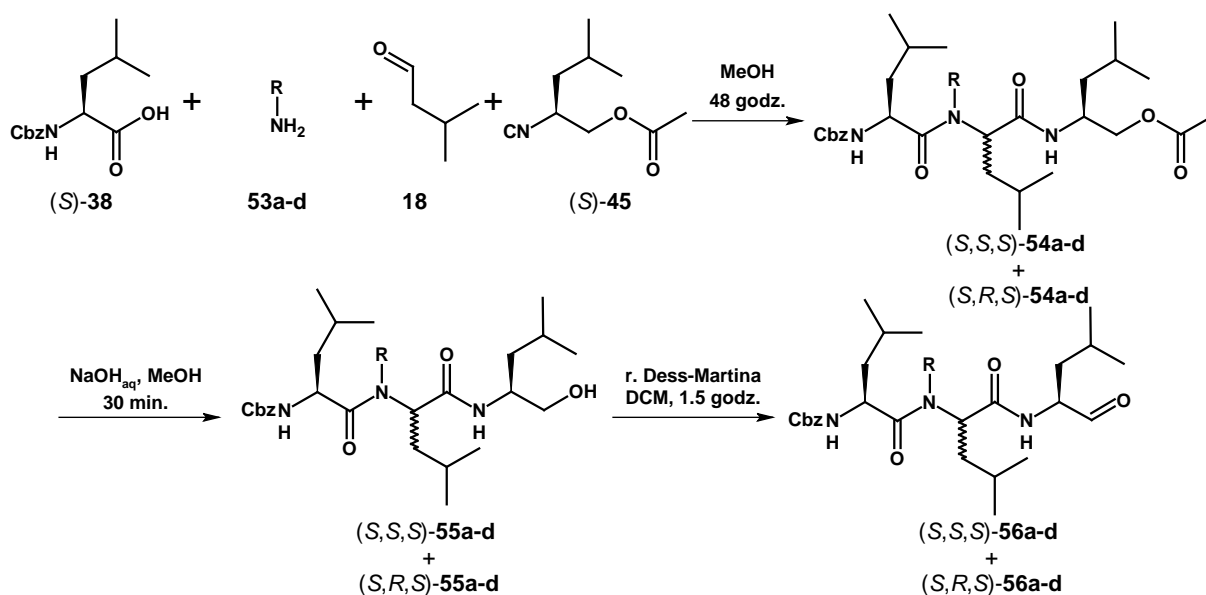
Wykres 2. Wpływ MG-132 oraz mieszaniny (*S,S,S*)- i (*S,R,S*)-**1** na inhibicję aktywności proteasomu w komórkach RAS-3T3 po 1 godz. inkubacji; k – próba kontrolna bez dodatku inhibitora – 100%.



6.7. Synteza aldehydów tripeptydowych posiadających *N*-zabezpieczone grupy amidowe

Po opracowaniu ogólnej metodologii syntezy tripeptydów z C-kończącą grupą aldehydową, postanowiono zmodyfikować ją do syntezy aldehydów tripeptydowych zawierających grupy zabezpieczające wiązanie amidowe wprowadzane do struktury w reakcji Ugiego. W ogólnej metodologii pomijany jest zatem etap usuwania tej grupy. Na tym etapie badań nie rozdzielano diastereoizomerycznych mieszanin produktów poszczególnych etapów.

Szkielety tripeptydowe otrzymano w reakcji Ugiego z zastosowaniem kwasu karboksylowego (*S*)-**38**, aldehydu izowalerianowego (**18**), izocyjanku (*S*)-**45** oraz czterech amin zawierających w strukturze pierścienie aromatyczne **53a** - **53d**. Dla przejrzystości wyników tych badań nadano nową numerację dla dwóch stosowanych już wcześniej amin. Jest to 2,4-dimetoksybenzyloamina (**53a**) (poprzednia numeracja **32**) oraz benzyloamina (**53b**) (poprzednia numeracja **23**). Pozostałe dwie stosowane aminy to 2-fenyletyloamina (**53c**) oraz anilina (**53d**). Produktami reakcji Ugiego była grupa mieszanin związków diastereoizomerycznych **54a-d**, otrzymanych z wydajnościami 42-82% (Schemat 28). Mieszanina związków (*S,S,S*)- i (*S,R,S*)-**54a** posiada również wcześniej nadaną numerację (*S,S,S*)- i (*S,R,S*)-**49**. Nowa numeracja została dokonana z tego samego powodu co w przypadku amin. Produkty reakcji multikomponentowych w reakcjach hydrolizy przeprowadzono w mieszaniny alkoholi **55** z wysokimi wydajnościami 94-98%. W ostatnim etapie, grupy alkoholowe w reakcjach z reagentem Dess-Martina utleniono do aldehydów **56**, które wydzielono z wydajnościami 71-89%. Wszystkie związki otrzymano jako mieszaniny



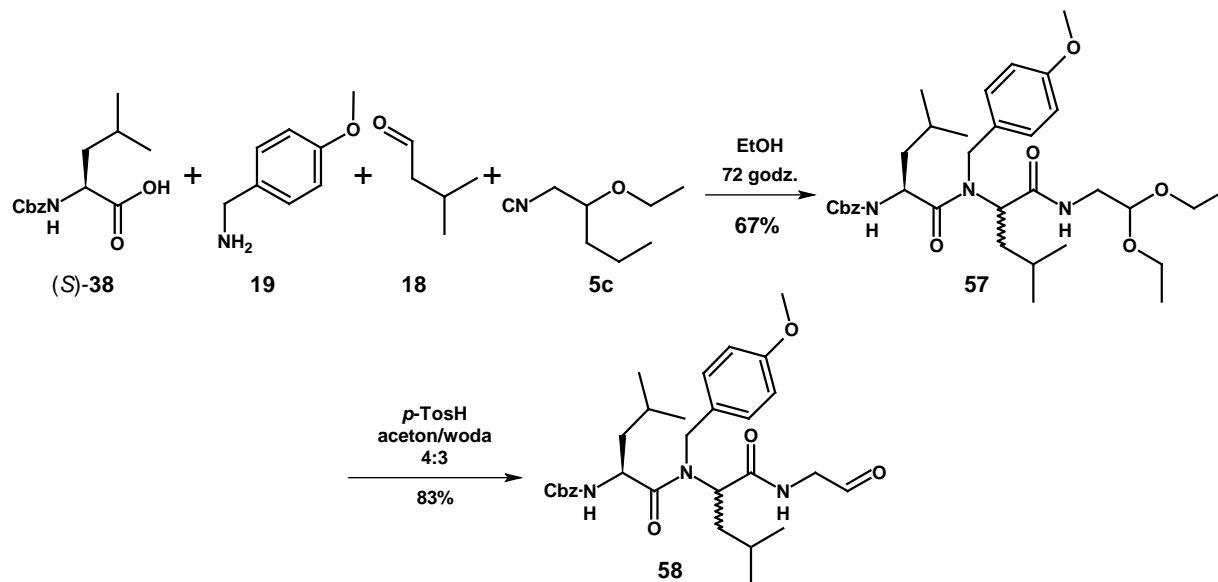
Schemat 28. Synteza aldehydów **56** z *N*-podstawionymi grupami amidowymi.

diastereoizomerów (*S,S,S*) i (*S,R,S*). Wydajności poszczególnych etapów syntezy aldehydów **56a-d** zgromadzone zostały w Tabeli 11. Niższymi wydajnościami niż zwykle osiągnęte charakteryzowały się reakcje Ugiego z zastosowaniem innych amin niż 2,4-dimetoksybenzyloamina.

Tabela 11. Wydajności etapów syntezy aldehydów **56a-d**.

L.p.	Amina	R	Wydajność reakcji Ugiego	Wydajność reakcji hydrolizy	Wydajność reakcji utleniania
1	53a	2,4-(MeO) ₂ -C ₆ H ₃ -	82%	95%	89%
2	53b	C ₆ H ₅ CH ₂ -	42%	98%	73%
3	53c	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂ -	56%	95%	81%
4	53d	C ₆ H ₅ -	50%	94%	71%

W reakcji Ugiego z zastosowaniem izocyjanku z grupą acetalową **5c** oraz *N*-benzyloksykarbonyloleucyną (*S*)-**38**, 4-metoksybenzyloaminą (**19**) i aldehydem izowalerianowym (**18**) otrzymano pochodną acetalową **57**. Produkt reakcji Ugiego w postaci mieszaniny epimerów poddano hydrolizie katalizowanej kwasem *p*-toluenosulfonowym analogicznie do metody syntezy związku **27** z acetalu **20c**. Produktem reakcji hydrolizy był aldehyd **58** otrzymany z dobrą wydajnością 83%. Produkt ten ma strukturę tripeptydu Cbz-Leu-nPmb-Leu-Gly-al jako mieszanina epimerów różniących się konfiguracją absolutną na węglu α środkowego aminokwasu (Schemat 29).



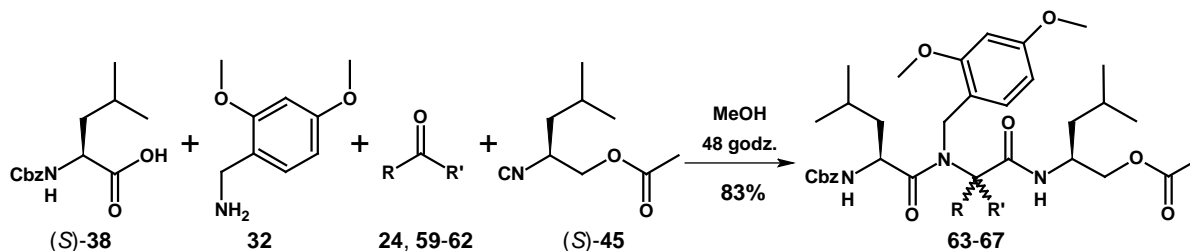
Schemat 29. Synteza aldehydu **58**.

Opracowane wcześniej metody mają zatem również zastosowanie do syntezy *N*-podstawionych tripeptydów z grupą aldehydową. Grupy zabezpieczające wiązanie amidowe mogą być zarówno grupami alkiloaromatycznymi (R = Dmb, Pmb, Bn, PhCH₂CH₂) lub grupą aromatyczną (R = Ph).

6.8. Badania nad zastosowaniem ketonów jako reagentów karbonylowych w reakcjach Ugiego

Kolejnym etapem badań było zastosowanie ketonów jako reagentów karbonylowych w reakcji Ugiego. Zastosowanie tego typu reagentów prowadzi do produktów o strukturze tripeptydów zawierających w swym szkielecie jeden α,α' -dipodstawiony aminokwas. W skład łańcuchów bocznych tego aminokwasu wchodzi atomy pochodzące od grup R i R' stosowanego jako substrat ketonu o wzorze ogólnym RCOR'.

Przeprowadzono szereg reakcji Ugiego z zastosowaniem *N*-benzyloksykarbonyloleucyny ((*S*)-**38**), aldehydu izowalerianowego (**18**), izocyjanku (*S*)-**45** oraz pięciu ketonów. Ketonami tymi były cykloheksanon (**24**) i aceton (**59**) oraz 3-metylocykloheksanon (**60**), keton metyloizobutyloowy (**61**) i keton etyloizobutyloowy (**62**). Produktami reakcji Ugiego były związki **63-67** (Schemat 30). Produkty otrzymano z



Schemat 30. Reakcje Ugiego z zastosowaniem ketonów jako reagentów karbonylowych.

dobrymi wydajnościami w przypadku zastosowania cyklicznych ketonów **24** i **60**, odpowiednio 66 i 67% (Tabela 12). Przy zastosowaniu acetonu jako reagenta karbonylowego wydajność reakcji była zdecydowanie niższa (35%). Najgorsze rezultaty osiągnięto przy zastosowaniu ketonów acyklicznych **61** i **62** posiadających dwie różne grupy alifatyczne. W przypadku zastosowania ketonu metyloizobutyloowego (**61**) otrzymano produkt **66** z bardzo niską wydajnością 6%. W reakcji z ketonem **62** oczekiwanego produktu **67** nie wydzielono. W obydwu przypadkach w mieszaninach reakcyjnych obserwowano złożone mieszaniny produktów ubocznych.

Tabela 12. Wydajności reakcji Ugiego z ketonami jako reagentami karbonylowymi.

L.p.	Keton	R	R'	Produkt	Wydajność [%]
1	24		-(CH ₂) ₄ -	63	66
2	59	-CH ₃	-CH ₃	64	35
3	60	-CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₂ -		65	67
4	61	-CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	66	6
5	62	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	67	-

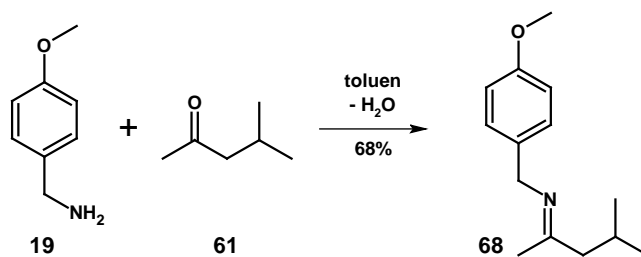
Reakcje z ketonami **61** i **62** powtórzono w warunkach modyfikowanych poprzez:

- zmianę rozpuszczalnika (dichlorometan, acetonitryl, toluen, dioksan);
- wydłużenie czasu reakcji do kilku dni;
- zmianę stosunku stechiometrycznych substratów;
- zmianę temperatury reakcji;
- dodatek kwasu Lewisa ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$);
- usuwanie wody powstającej w procesie tworzenia iminy przez dodatek bezwodnego siarczanu magnezu lub wyprężonych sit molekularnych.

Zmiana warunków reakcyjnych nie powodowała jednak wzrostu wydajności reakcji Ugiego.

Wyższe wydajności reakcji z zastosowaniem cyklicznych ketonów mogą być spowodowane większym naprężeniem wiązań sąsiadujących z grupą karbonylową co wiąże się z odsłonięciem dostępu do niej. Reaktywność tych ketonów jest zatem porównywalna do reaktywności aldehydów. W przypadku ketonów acyklicznych dobre rezultaty można osiągnąć jedynie z nierozbudowanymi sterycznie związkami tego typu takich jak aceton. W przypadku stosowania rozbudowanych sterycznie ketonów **61** i **62** produkty otrzymano z bardzo niską wydajnością lub w ogóle nie były obserwowane. Podobne zależności obserwowane były w przypadku innych badań nad zastosowaniem ketonów w reakcjach Ugiego.¹¹

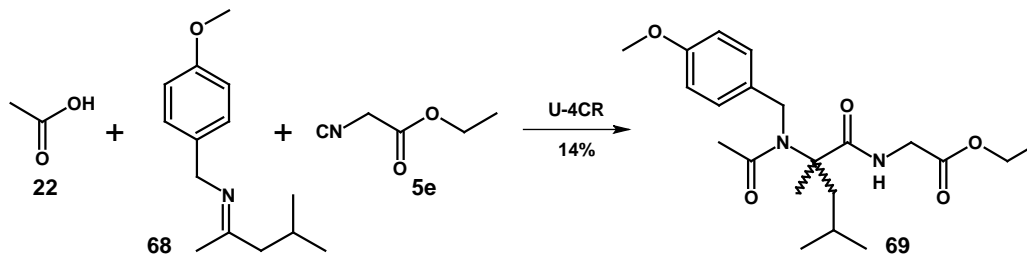
Ponieważ bezpośrednie stosowanie sterycznie rozbudowanych ketonów nie było efektywne, przeprowadzono wstępną syntezę i wydzielenie iminy w reakcji *p*-metoksybenzyloaminy (**19**) z ketonem metyloizobutyloowym (**61**). Reakcję prowadzono w aparaturze Deana-Starka metodą destylacji azeotropowej powstającej wody z tolueniem. Iminę **68** otrzymano tą metodą z wydajnością 68% (Schemat 31).



Schemat 31. Synteza iminy **68**.

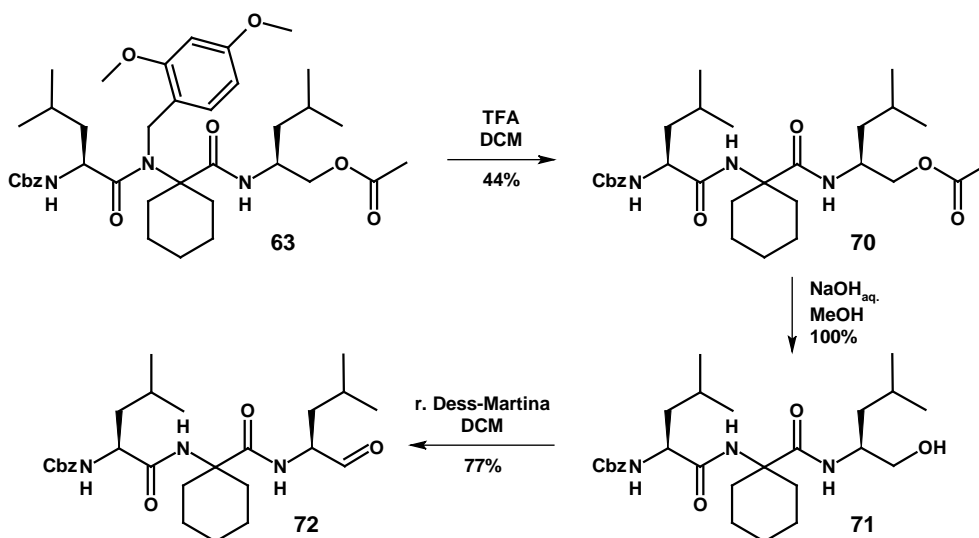
Iminę **68** wprowadzono w modelową reakcję Ugiego z kwasem octowym (**22**) oraz izocyjanooctanem etylu **5e** (Schemat 32). W reakcji powstawała złożona mieszanina produktów, z której wydzielono produkt **69** z niską wydajnością 14%. W kolejnych syntezach zastosowano bardziej rozbudowane sterycznie reagenty kwasowe oraz izocyjankowe. Niestety

przy zastąpieniu kwasu octowego *N*-benzyloksykarbonyloglicyną (**2**) lub *N*-benzyloksykarbonyloleucyną ((*S*)-**38**) oraz izocyjanku **5e** izocyjankiem (*S*)-**45** ponownie otrzymano złożone mieszaniny, z których nie wydzielono oczekiwanych produktów reakcji Ugiego.



Schemat 32. Reakcja Ugiego z zastosowaniem iminy **68**.

W następnym etapie tej części badań jeden z otrzymanych produktów reakcji Ugiego przeprowadzono w aldehyd zgodnie z opracowaną wcześniej metodologią. Związkiem tym był produkt **63** otrzymany w reakcji Ugiego z zastosowaniem cykloheksanonu. W reakcji usunięcia grupy 2,4-dimetoksybenzylowej, hydrolizy grupy estrowej oraz utlenienia grupy alkoholowej otrzymano aldehyd **72** z całkowitą wydajnością 21% dla czterech etapów syntezy (Schemat 33).



Schemat 33. Synteza aldehydu **72** z α,α -dipodstawionym aminokwasem w cząsteczce.

Podsumowując. Wyniki badań nad zastosowaniem ketonów do reakcji Ugiego potwierdzają doniesienia literaturowe w tym zakresie. Produkty otrzymano z umiarkowaną wydajnością w reakcjach, w których zastosowano ketony cykliczne lub nierozbudowane sterycznie. Zastosowanie rozbudowanych przestrzennie ketonów zarówno w formie wolnej jak i otrzymanej wstępnie iminy prowadziło w nielicznych reakcjach do produktów. Produkty te były jednak wydzielone z niską wydajnością $< 14\%$. Niemniej jednak przy zastosowaniu ketonów do reakcji Ugiego oraz dalszej funkcjonalizacji produktów tych reakcji zgodnie z

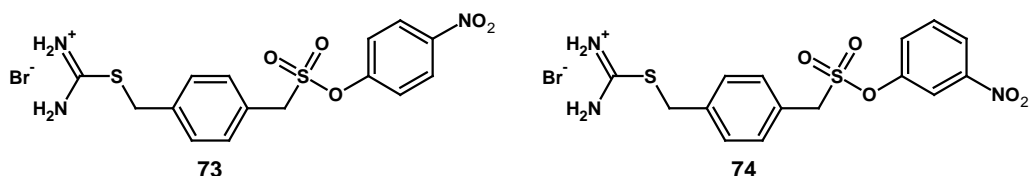
opracowaną wcześniej metodą można otrzymać aldehydy tripeptydowe z jednym α,α -dipodstawionym aminokwasem w strukturze, którego przykładem jest aldehyd **72**.

6.9. Badania nad syntezą tripeptydów z C-końcowymi ugrupowaniami soli tiomocznikowych i grupami estrowymi kwasów fosfonowych

W części literaturowej niniejszej pracy przedstawiono wpływ różnych C-końcowych ugrupowań na aktywność biologiczną związków o strukturze tripeptydów. Do otrzymanych wcześniej związków postanowiono więc wprowadzić ugrupowania, których obecność może wpłynąć na aktywność enzymów proteolitycznych. Są to ugrupowania soli tiomocznikowych oraz estrów kwasów fosfonowych.

6.9.1. Badania nad wprowadzeniem ugrupowania soli tiomocznikowej do struktury tripeptydów

Znane są związki posiadające w swej strukturze ugrupowania soli tiomocznikowych hamujące aktywność trypsynopodobną enzymów proteolitycznych.¹⁶⁹ Związkami tymi są estry nirtrofenylowe kwasu benzenosulfonowego (BSA) oraz kwasu fenylometanosulfonowego (PMS). Związkami o najwyższej aktywności w tej grupie są



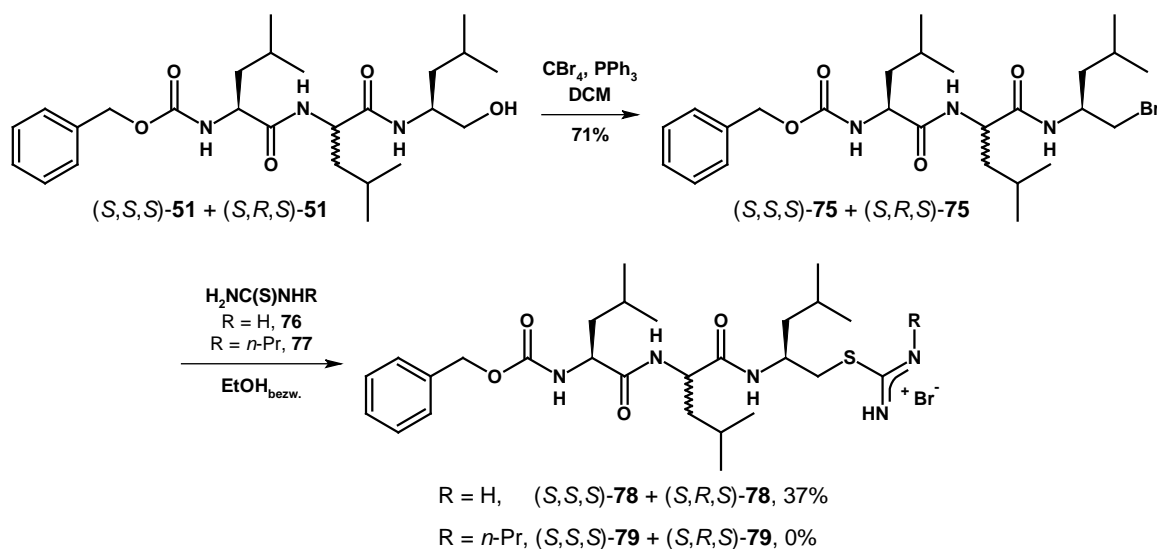
Rysunek 3. Przykłady inhibitorów enzymów proteolitycznych z ugrupowaniem soli tiomocznikowej.

struktury **73** i **74** (Rysunek 3). Są to odpowiednio estry *para*- i *meta*-nitrofenolu kwasu PMS. Ponadto są to sole bromkowe *N*-niepodstawionych tiomoczników. Wykazano, że związki te w sposób selektywny hamują aktywność trypsyny. Związek **73** w mniejszym stopniu hamuje również aktywność urokinazy oraz plazminy, natomiast **74** jest inhibitorem nie powodującym zmiany aktywności pozostałych badanych enzymów. Wykazano również, że obecność ugrupowania soli tiomocznikowej jest warunkiem niezbędnym do osiągnięcia aktywności tych związków. Zastąpienie tej grupy innymi (dimetylosulfoniową, amoniową lub pirydyniową) powodowało dezaktywację związku. Przypuszcza się, że to obdarzone ładunkiem dodatnim ugrupowanie soli tiomocznikowej odpowiedzialne jest za oddziaływanie z ugrupowaniem β -karboksylowym reszty kwasu asparaginowego znajdującej się w jednej z

wnęć centrum aktywnego enzymu. Ponadto, podstawienie grupą metylową jednego z atomów azotu grupy tiomocznikowej powodowało również zmniejszenie aktywności inhibitora.¹⁶⁹

Wykorzystując powyższe informacje postanowiono wprowadzić ugrupowanie soli tiomocznikowej do struktury tripeptydów. Jako, że duży wpływ na aktywność biologiczną ma rodzaj grup C-końcowych zaprojektowano proces zastąpienia grupy aldehydowej w aldehydach tripeptydowych **1** grupą soli tiomocznikowej. Reakcje prowadzono na mieszaninach epimerów (*S,S,S*)- i (*S,R,S*)-**1**.

Sole tiomocznikowe otrzymuje się poprzez *S*-alkilowanie podstawionych lub niepodstawionych tiomoczników odpowiednimi pochodnymi halogenowymi. Odpowiednią mieszaninę bromków otrzymano poprzez reakcję mieszaniny diastereoizomerycznych alkoholi **51** z czterobromkiem węgla w obecności trifenylofosfiny. W ten sposób otrzymano bromek **75** jako mieszaninę epimerów z wydajnością 71%. Bromek **75** posłużył do alkilowania niepodstawionego tiomocznika **76** i *N*-*n*-propylotiomocznika **77**. W przypadku dostępu mieszaniny reakcyjnej do wilgoci lub stosowania niedosuszonych rozpuszczalników obserwuje się powstawanie znacznej ilości alkoholu **51**. W reakcji w takich warunkach mieszaninę alkoholi **51** otrzymano z wydajnością 31%. Wydzielono również nieprzereagowany substrat z wydajnością 20%. Reakcję alkilowania tiomocznika **76** należy prowadzić w ściśle bezwodnych warunkach. W takich warunkach otrzymano mieszaninę produktów z grupą soli tiomocznikowej **78** z niską wydajnością 37% (Schemat 34).



Schemat 34. Synteza tripeptydów z C-końcowym ugrupowaniem soli tiomocznikowej.

W przypadku reakcji z *N*-podstawionym tiomocznikiem **77** produktu **79** nie otrzymano nawet w ściśle bezwodnych warunkach. Obserwowano pełną konwersję substratu, jednakże jedynym produktem reakcji była mieszanina alkoholi **51**.

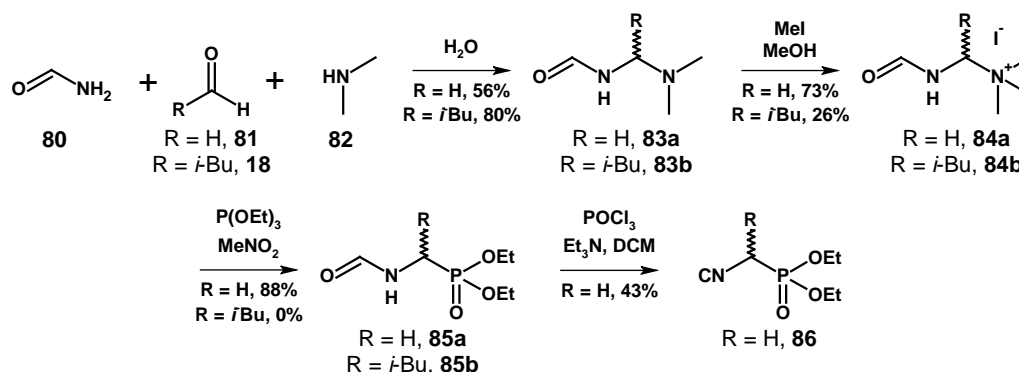
Otrzymanie soli tiomocznikowych okazało się więc trudne do zrealizowania. W stosowanych warunkach obserwowano produkty uboczne, a oczekiwane produkty, o ile w ogóle uzyskano, wydzielono z niską wydajnością.

Badania biologiczne soli tiomocznikowej **78** nie wykazały wysokiej aktywności jako inhibitora proteasomów w komórkach NIH-3T3 i RAS-3T3.

6.9.2. Badania nad wprowadzeniem do struktury tripeptydów C-końcowej grupy estrowej kwasu fosfonowego

Znane są liczne struktury peptydowe i niepeptydowe z grupami estrowymi kwasów fosfonowych wykazujące aktywność inhibitorów enzymów hydrolitycznych. Związki te są inhibitorami butyrylocholinerazy¹⁷⁰ a także proteaz serynowych takich jak subtilizyna,¹⁷⁰ trypsyna,^{171,170,172} α -chymotrypsyna,^{170,173} urokinaza,^{171,174} oraz katepsyna G.¹⁷⁵

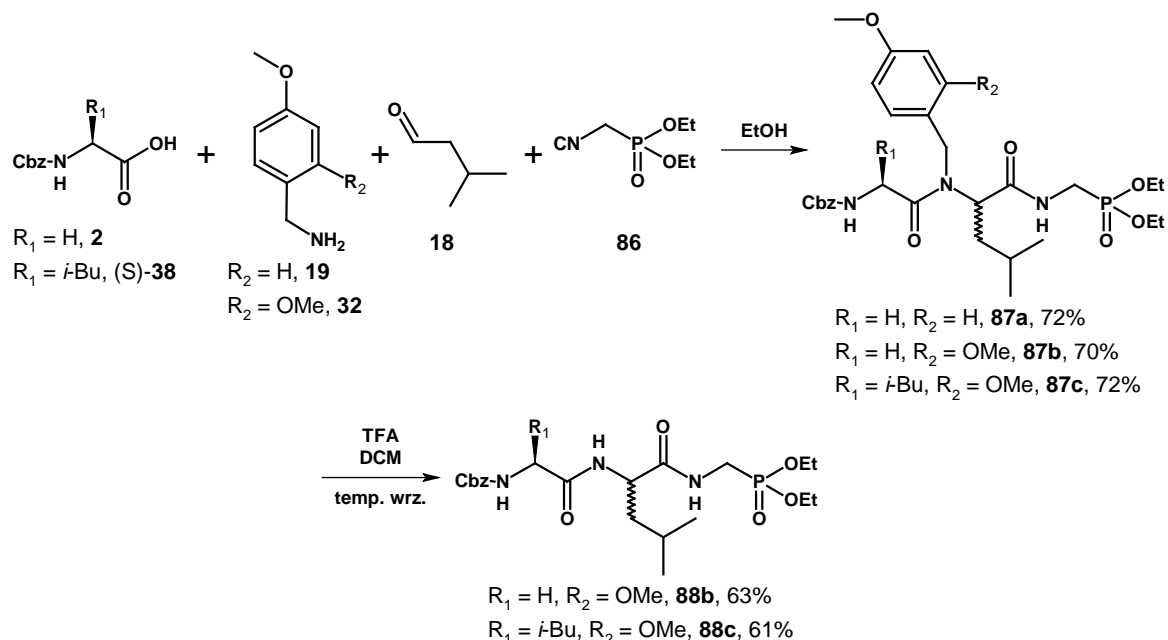
W związku z dużą aktywnością biologiczną związków posiadających grupy estrowe kwasów fosfonowych postanowiono wprowadzić grupy tego typu do struktury tripeptydów na ich C-końcach. Grupy te można wprowadzić w tą pozycję poprzez zastosowanie do reakcji Ugiego izocyjanków zawierających te ugrupowania. Syntezę izocyjanków prowadzono zgodnie z metodą opracowaną przez Rachonia i Schollkopa (Schemat 35).^{176,177} W pierwszym etapie w reakcjach Mannicha¹⁷⁸ między formamidem (**80**), dimetyloaminą (**82**) w formie roztworu wodnego oraz paraformaldehydem (**81**) lub aldehydem izowalerianowym (**18**) otrzymano formamidowe pochodne amin trzeciorzędowych **83a** i **83b**. Związki te otrzymano odpowiednio z wydajnościami 56 i 80%. Następnie przeprowadzono czwartorzędowanie grupy aminowej i otrzymano sole amoniowe **84a** i **84b** z wydajnościami 73 i 26%. Kolejnym etapem była synteza estrów kwasu fosfonowego w reakcji soli amoniowej z estrem kwasu fosforowego (III). W reakcji soli **84a** z fosforanem (III) trimetylu nie otrzymano oczekiwanego estru fosfonowego. Produkt **85a** otrzymano natomiast po



Schemat 35. Synteza izocyjanku z grupą estrową kwasu fosfonowego **86**.

zastosowaniu fosforanu (III) trietylu. Wydzielono go w procesie destylacji z dobrą wydajnością 88%. Niestety w analogicznej reakcji nie udało się otrzymać produktu **85b**. W ostatnim etapie przeprowadzono odwodnienie grupy formamidowej z zastosowaniem tlenochlorku fosforu. Izocyjanek **86** otrzymano tą metodą z wydajnością 43% (Schemat 35).

Otrzymany izocyjanek **86** zastosowano do syntezy związków o strukturze peptydów. Stosowano go jako substrat w reakcji Ugiego razem z *N*-Cbz-Gly-OH (**2**) lub *N*-Cbz-Leu-OH ((*S*)-**38**), 4-metoksybenzyloaminą (**19**) lub 2,4-dimetoksybenzyloaminą (**32**) oraz aldehydem izowalerianowym (**18**). Produkty reakcji Ugiego **87a** – **87c** otrzymano ze zbliżonymi wydajnościami 70 – 72% (Schemat 36). Produkty **87b** i **87c** poddano reakcji odbezpieczenia wiązania amidowego poprzez usunięcie grupy Dmb. W reakcji z kwasem trifluorooctowym otrzymano związki **88b** i **88c** odpowiednio z wydajnościami 63 i 61%.



Schemat 36. Synteza tripeptydów z C-końcową grupą estru kwasu fosfonowego.

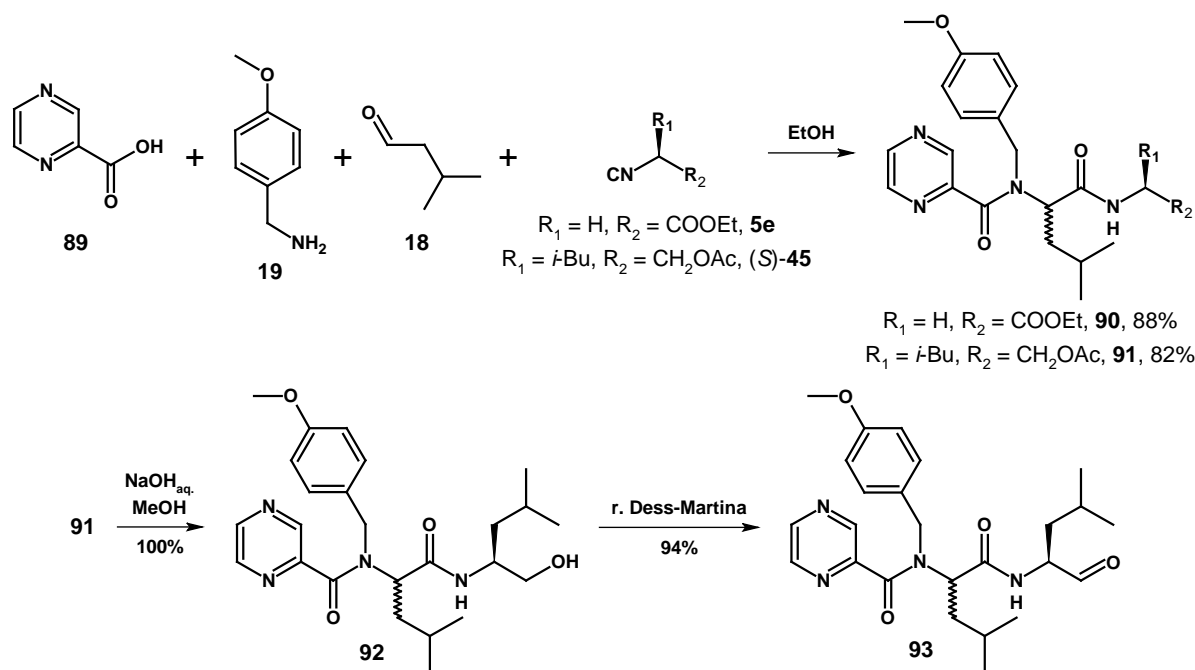
W związku z trudnościami związanymi z syntezą izocyjaneku z grupą estrową kwasu fosfonowego i grupą izobutylową niemożliwe było otrzymanie tripeptydów z trzema łańcuchami bocznymi leucyny. Przedstawiono natomiast wydajną metodę zastosowania tego typu izocyjaneków do syntezy pochodnych peptydowych **88b** i **88c**.

6.10. Badania nad syntezą dipeptydów na drodze reakcji Ugiego z niepeptydowymi kwasami karboksylowymi

W kolejnych badaniach wykorzystano różnego typu niepeptydowe kwasy karboksylowe jako reagenty w reakcji Ugiego. W ten sposób otrzymano związki o strukturze dipeptydów z niepeptydowymi grupami N-końcowymi.

6.10.1. Badania nad zastosowaniem kwasu 2-pirazynokarboksyłowego w reakcji Ugiego

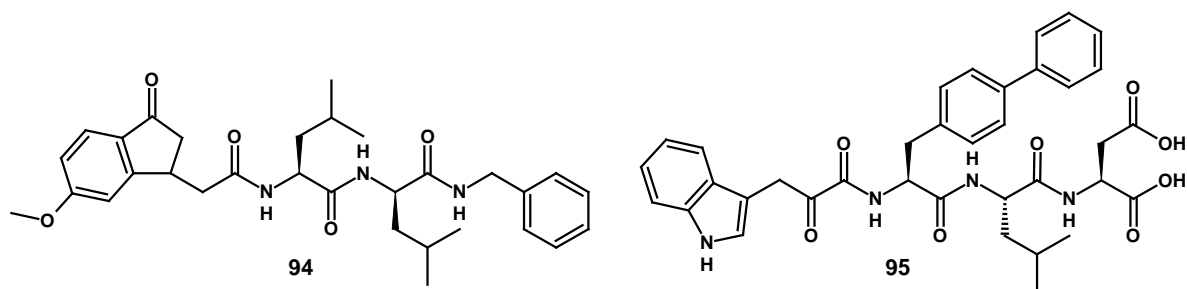
Wzorując się na strukturze jednego z najbardziej aktywnych inhibitorów proteasomów, którym jest bortezomib (**83** w Części literaturowej), postanowiono wprowadzić do struktury produktów N-końcową grupę 2-pirazynokarbonylową. Syntezę prowadzono na drodze reakcji Ugiego z zastosowaniem kwasu 2-pirazynokarboksyłowego (**89**), 4-metoksybenzyloaminy (**19**), aldehydu izowalerianowego (**18**) oraz izocyjanooctanu etylu (**5e**) lub chiralnego izocyjanku (*S*)-**45**. W reakcjach otrzymano odpowiednio produkty **90** i **91** z wydajnościami 88 i 82% (Schemat 37). Produkt **91** otrzymany z zastosowaniem izocyjanku (*S*)-**45** pochodnego leucyny poddano reakcji hydrolizy do alkoholu **92** i utlenieniu reagentem Dess-Martina do aldehydu **93**. Wszystkie etapy syntezy charakteryzowały się bardzo wysokimi wydajnościami.



Schemat 37. Synteza dipeptydów z N-końcową grupą 2-pirazynokarbonylową.

6.10.2. Badania nad zastosowaniem pochodnych indolowych z grupą karboksylową jako reagentów kwasowych w reakcji Ugiego

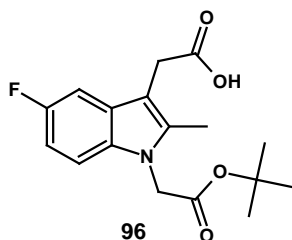
Wśród inhibitorów proteasomów znane są struktury zawierające pierścienie indanonowe, indolinonowe oraz indolowe. Pochodne indanonowe mają strukturę dipeptydów, a w skład najbardziej aktywnych przedstawicieli tej grupy związków wchodzi cząsteczka leucyny o nienaturalnej konfiguracji. Przykładem tej grupy jest związek **94** ($\text{IC}_{50} = 0,93 \mu\text{M}$), w którym grupa indanonowa znajduje się na N-końcu łańcucha peptydowego (Rysunek 1).¹⁷⁹



Rysunek 1. Związki biologicznie czynne z ugrupowaniem indanowym **94** i indolowym **95**.

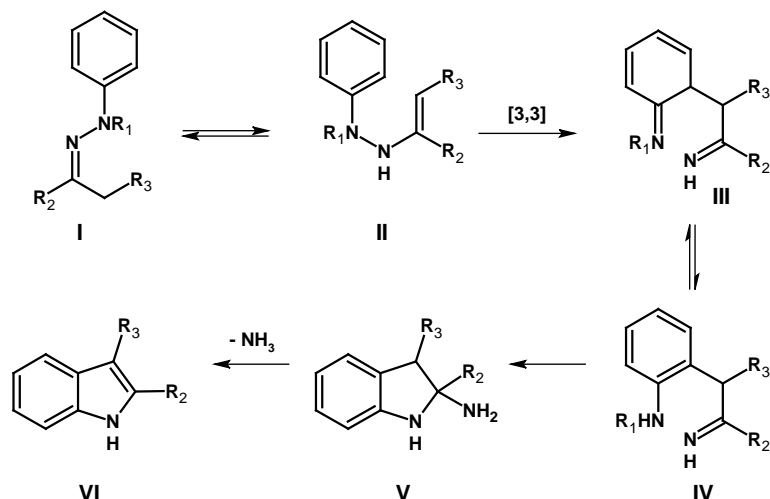
Przykładem inhibitora z grupą indolinonową jest opisany w Części literaturowej cykliczny związek TMC-95 (**108 Cz. lit.**).¹²⁰ Inhibitory proteasomów z grupą indolową reprezentowane są przez grupę cyklicznych oraz liniowych pochodnych związku TMC-95,^{121,180} oraz przez grupę związków liniowych z grupą indolową na ich N-końcach. Najbardziej aktywnym związkiem w tej grupie jest tripeptyd **95** ($IC_{50} = 1 \mu\text{g} / \text{ml}$) posiadający nienaturalny 4-fenylbenzylowy łańcuch boczny jednego z aminokwasów budujących peptyd (Rysunek 1).¹⁸¹ Ponadto związki z ugrupowaniem indolowym posiadają inne właściwości biologiczne: inhibicja cyklooksygenazy-2,¹⁸² antagonizm receptora CRTH2,¹⁸³ inhibicja cytozolowej fosfolipazy $A_{2\alpha}$.¹⁸⁴

Wzorując się na strukturach związków biologicznie aktywnych posiadających ugrupowanie indolowe jako reagent kwasowy reakcji Ugiego zaproponowano związek **96** (Rysunek 2).



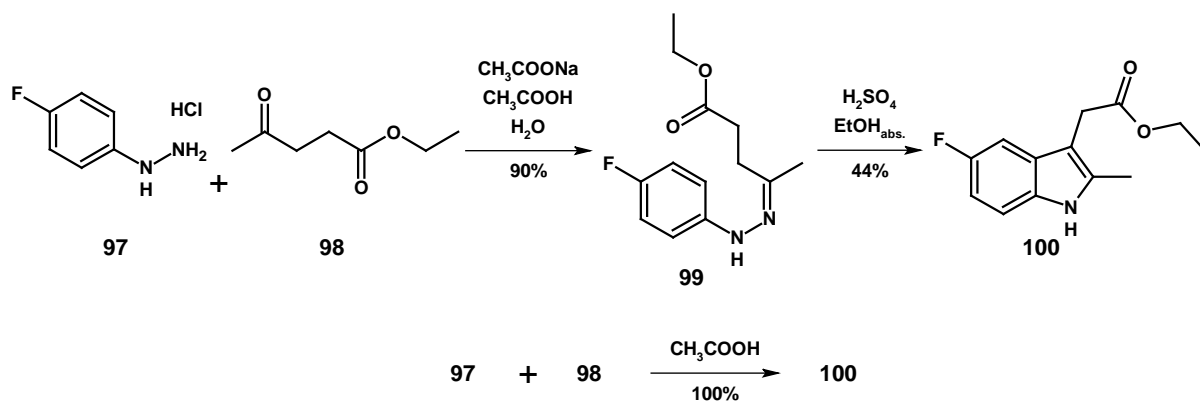
Rysunek 2. Związek indolowy **96** zaproponowany jako reagent kwasowy reakcji Ugiego.

Ugrupowanie indolowe może być otrzymane na drodze cyklizacji Fischera *N*-arylohydrazonów typu **I** (Schemat 38). W wyniku tautomeryzacji katalizowanej kwasem powstaje eno-hydrazyna **II**, która ulega przegrupowaniu sigmatropowemu typu [3,3] z utworzeniem produktu pośredniego o strukturze bis-iminy **III**. Struktura ta ulega aromatyzacji, której produktem jest pochodna anilinowa **IV**. Wewnątrzcząsteczkowy atak nukleofilowy atomu azotu na węgiel iminiowy prowadzi do aminalu **V**, który po utracie amoniaku daje indol o strukturze **VI**.¹⁸⁵



Schemat 38. Mechanizm reakcji cyklizacji Fischera hydrazonów do indoli.

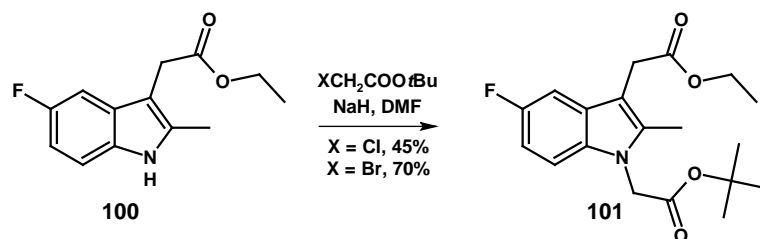
N-Arylohydrazony typu **I** otrzymuje się w reakcji Jappa-Klingermanna aromatycznych hydrazyn z odpowiednimi ketoestrami.¹⁸⁶ Syntezę indolu **96** rozpoczęto od otrzymania hydrazonu **99** w wyniku kondensacji chlorowodoru 4-fluorofenylohydrazyny **97** z esterm etylowym kwasu lewulinowego **98** w obecności octanu sodu oraz kwasu octowego. Produkt kondensacji otrzymano z wydajnością 90%. Następnie hydrazon poddano reakcji cyklizacji Fischera katalizowanego kwasem siarkowym. Otrzymano w ten sposób indol **100** z wydajnością 44%. Ponieważ produkt reakcji cyklizacji otrzymano ze średnią wydajnością, metodę syntezy indolu **100** zmodyfikowano. Produkt ten otrzymano w jednoetapowym procesie kondensacji i cyklizacji w reakcji hydrazyny **97** i ketonu **98** w kwasie octowym w temperaturze wrzenia. W reakcji otrzymano indol **100** z wydajnością 100% oraz czystością 83% określoną za pomocą chromatografii gazowej (Schemat 39).



Schemat 39. Synteza indolu **100** na drodze syntezy dwu- i jednoetapowej.

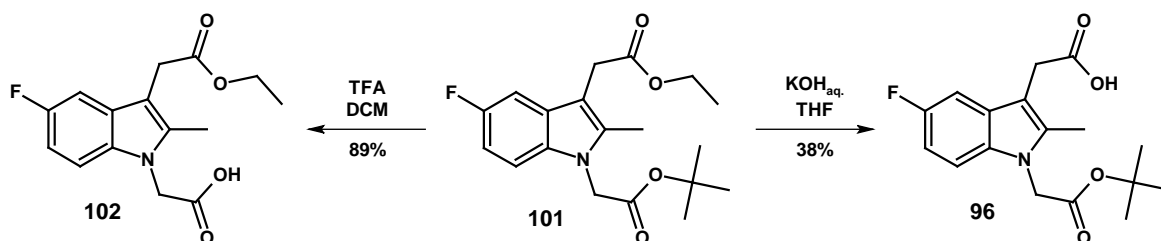
Indol **100** otrzymany zarówno w procesie jednoetapowym, jak i dwuetapowym charakteryzował się zbliżoną reaktywnością w kolejnym etapie syntezy. Indol **100** poddano reakcji *N*-alkilowania z zastosowaniem chloro- oraz bromooctanu *tert*-butylu. Bardziej

wydajnym reagentem alkilującym był bromooctan *tert*-butylu, w reakcji z którym otrzymano diester **101** z wydajnością 70%. W przypadku zastosowania chlorooctanu *tert*-butylu ten sam produkt otrzymano z wydajnością 45% (Schemat 40).



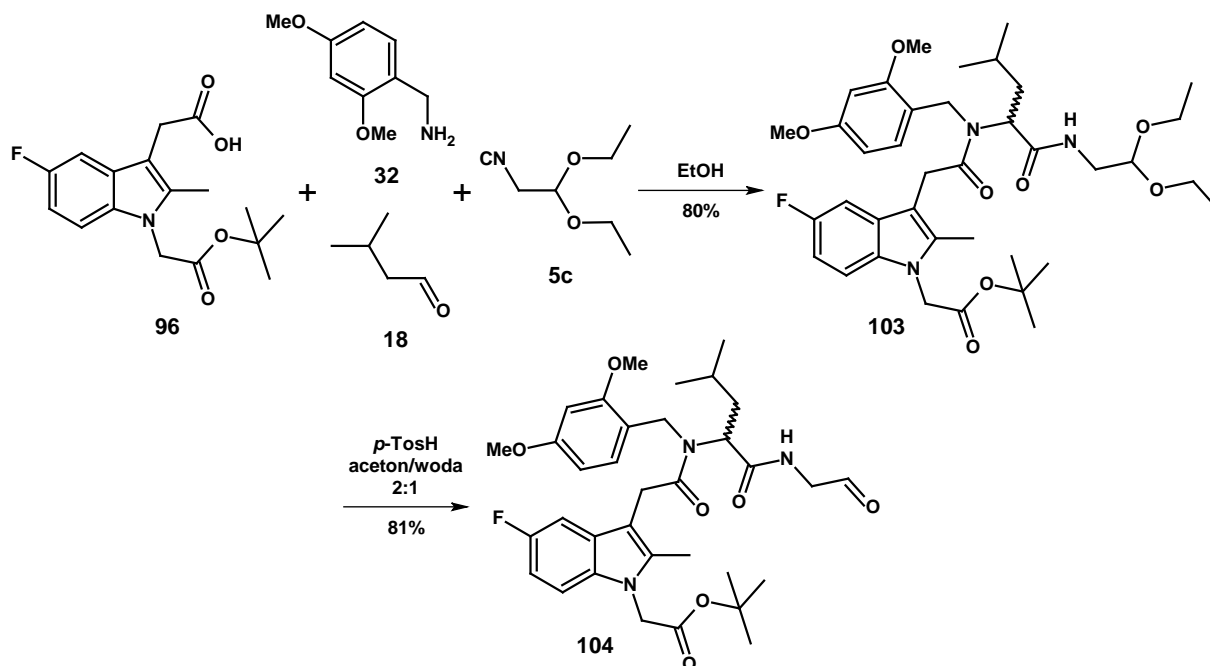
Schemat 40. Reakcja *N*-alkilowania indolu **100** do diestru **101**.

Diester **101** był funkcjonalizowany do dwóch monokwasów. W reakcji hydrolizy grupy estrowej alkoholu *tert*-butylowego katalizowanej kwasem trifluorooctowym otrzymano monokwas **102** z wysoką wydajnością 89% (Schemat 41). Z kolei problem stanowiła hydroliza grupy estrowej alkoholu etylowego w diestrze **101**. W zasadowych warunkach reakcji hydrolizy labilna jest bowiem również grupa estrowa alkoholu *tert*-butylowego. W efekcie powstawał produkt uboczny hydrolizy obydwu grup estrowych w postaci dikwasu. Monokwas **96** otrzymano z wydajnością nie przekraczającą 38% w reakcji katalizowanej wodorotlenkiem potasu w tetrahydrofuranie użytym jako rozpuszczalnik (Schemat 41). Zastosowanie innych zasad, rozpuszczalników oraz obniżenie temperatury reakcji i skrócenie czasu reakcji nie powodowało podwyższenia wydajności reakcji.



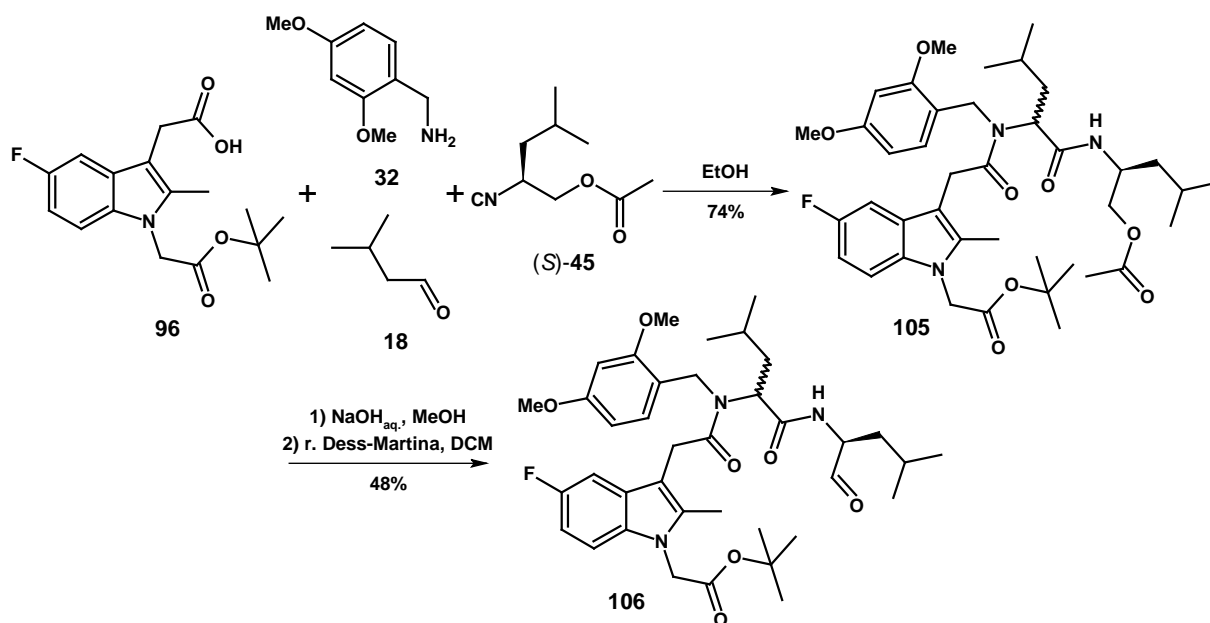
Schemat 41. Hydroliza kwasowa i zasadowa diestru **101**.

Otrzymany monokwas **96** zastosowano jako reagent kwasowy do reakcji Ugiego. Pozostałymi reagentami była 2,4-dimetoksybenzyloamina (**32**), aldehyd izowalerianowy (**18**) oraz izocyjanek **5c** lub (*S*)-**45**. W reakcji Ugiego z izocyjankiem **5c** otrzymano produkt z grupą acetalową **103** z wydajnością 80% (Schemat 42). Hydroliza grupy acetalowej w **103** katalizowana kwasem *p*-toluenosulfonowym prowadziła do aldehydu **104**. W reakcji z izocyjankiem (*S*)-**45** otrzymano natomiast produkt **105** z wydajnością 74%. Hydroliza grupy acetoksylowej i utlenienie grupy hydroksylowej do alkoholowej z zastosowaniem reagenta



Schemat 42. Synteza aldehydu **104** na drodze reakcji Ugiego oraz hydrolizy grupy acetalowej.

Dess-Martina prowadziła do aldehydu dipeptydowego **106** z ugrupowaniem indolowym z sumaryczną wydajnością dla dwóch etapów wynoszącą 48% (Schemat 43).



Schemat 43. Synteza aldehydu z ugrupowaniem indolowym **106**.

W produktach reakcji Ugiego **103** i **105** niemożliwe było usunięcie grupy Dmb zabezpieczającej grupy amidowej. Było to spowodowane obecnością w tych związkach kwasolubilnych grup estrowych alkoholi *tert*-butylowych. W związku **103** znajdują się trzy kwasolabilne ugrupowania: ester *tert*-butylowy, grupa acetalowa oraz grupa Dmb

zabezpieczająca grupę amidową. Jednoetapowa funkcjonalizacja tych trzech grup byłaby cennym narzędziem w syntezie karboksyaldehydów peptydowych tego typu. W wyniku reakcji **103** i **105** z kwasem trifluorooctowym każdorazowo otrzymywano skomplikowane mieszaniny produktów.

Zaprezentowane syntezy aldehydów **93**, **103** i **105** wskazują na możliwość zastosowania opracowanej metodologii również do syntezy związków z ugrupowaniami niepeptydowymi. Niekiedy dobór substratu karboksylowego powoduje brak możliwości usunięcia grupy 2,4-dimetoksybenzylowej zabezpieczającej wiązanie amidowe w produktach reakcji Ugiego. Niemniej jednak metoda ta jest dobrym narzędziem do syntezy związków o potencjalnej aktywności biologicznej.

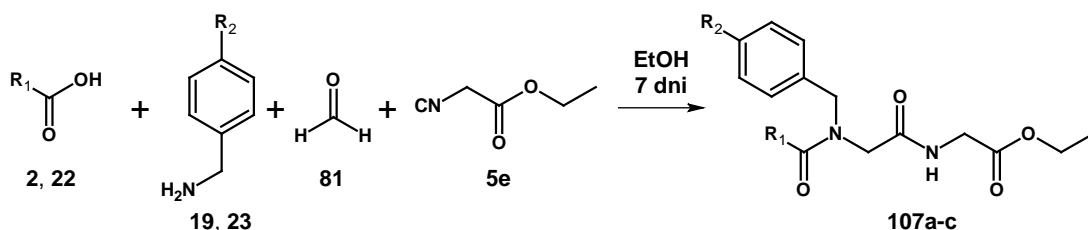
6.11. Badania nad zastosowaniem reakcji Ugiego do syntezy peptoidów o strukturze *N*-alkilowanych oligoglicyn

Klasyczne metody syntezy peptoidów o strukturze *N*-alkilowanych oligoglicyn zgodnie z przykładami przedstawionymi w Rozdziale 5 Części literaturowej ograniczają się głównie do zastosowania wielokrotnie powtarzanej reakcji sprzęgania monomerów peptoidowych oraz alkilowania tak otrzymanych struktur oligoglicynowych.

W tym rozdziale przedstawione zostaną wyniki badań nad alternatywną syntezą peptoidów z zastosowaniem reakcji Ugiego. Aby w reakcji Ugiego otrzymać szkielet peptoidowy zbudowany z trzech cząsteczek glicyny jako reagent karbonylowy stosuje się formaldehyd natomiast jako reagenty karboksylowe oraz izocyjankowe stosowane są pochodne glicyny.

Wpływ stosowanej jako reagent karbonylowy formy formaldehydu na wydajność reakcji Ugiego nie był jak dotąd szczegółowo dyskutowany w literaturze. Dlatego też w pierwszej kolejności wykonano badania mające na celu wskazanie odpowiedniej formy formaldehydu, której stosowanie prowadzi do powstawania produktów z najwyższą wydajnością. Sprawdzone takie formy formaldehydu jak: paraformaldehyd (forma polimerowa $(\text{CH}_2\text{O})_n$), formalina (37% wodny roztwór) oraz 1,3,5-trioksan (cykliczna forma trimerowa formaldehydu - $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$).

W modelowych reakcjach Ugiego z zastosowaniem paraformaldehydu, formaliny oraz trioksanu użyto również kwas octowy (**22**) lub *N*-benzylotykarbonyloglicynę (**2**) jako reagenty kwasowe, benzyloaminę (**23**) lub 4-metoksybenzyloaminę (**19**) jako reagenty



Schemat 44. Synteza peptoidów w reakcji Ugiego z zastosowaniem formaldehydu.

aminowe oraz izocyjanooctan etylu (**5e**) (Schemat 44). Wszystkie reagenty stosowane były w ilościach równomolowych. Jako rozpuszczalnik zastosowano etanol. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 7 dni. Wydajności reakcji zebrano w Tabeli 13. W reakcjach Ugiego z zastosowaniem benzyloaminy (Tabela 13, L.p. 1-6) widoczny jest duży wpływ formy formaldehydu na wydajność reakcji. W reakcjach, z zastosowaniem odpowiednio kwasu octowego (**22**) oraz Cbz-Gly-OH (**2**), w których formaldehyd stosowany był w formie paraformaldehydu (L.p. 1 i 4) produkty **107a** i **107b** wydzielono odpowiednio z wydajnościami 77 i 89%. Zdecydowanie niższymi wydajnościami charakteryzowały się reakcje z zastosowaniem formaliny (L.p. 2 i 5). Produkty **107a** i **107b** wydzielono z prawie czterokrotnie niższymi niż poprzednio wydajnościami, odpowiednio 22 i 24%. Produktów nie obserwowano natomiast w przypadku reakcji z zastosowaniem 1,3,5-trioksanu. Mogło to wynikać z braku rozpuszczalności tego reagenta w etanolu, co wpłynęło jednocześnie na jego niską reaktywność.

Tabela 13. Wyniki syntez związków **107a-c** w reakcjach Ugiego z zastosowaniem różnych form formaldehydu.

L.p.	Kwas	R ₁	Amina	R ₂	Forma formaldehydu	Produkt	Wydajność [%]
1					paraformaldehyd	107a	77
2	22	CH ₃	23	H	formalina	107a	22
3					trioksan	107a	0
4					paraformaldehyd	107b	89
5	2	Cbz-NH-CH ₂	23	H	formalina	107b	24
6					trioksan	107b	0
7					paraformaldehyd	107c	48
8	22	CH ₃	19	OMe	formalina	107c	47
9					trioksan	107c	0

Inną zależność wydajności reakcji od stosowanej formy formaldehydu otrzymano w reakcjach z 4-metoksybenzyloaminą (**19**). W reakcjach tych z zastosowaniem paraformaldehydu oraz formaliny otrzymano produkt **107c** z bardzo zbliżonymi wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 48 i 47% (Tabela 13, L.p. 7 i 8). Ponownie nie wydzielono produktu reakcji prowadzonej z zastosowaniem trioksanu.

W kolejnym etapie sprawdzono wpływ rodzaju rozpuszczalnika (etanol lub woda) oraz różnego typu dodatków na wydajność reakcji z zastosowaniem paraformaldehydu. Jako modelową reakcję w tej części badań wybrano reakcję z zastosowaniem paraformaldehydu, której produktem był peptoid **107a**. Zgodnie z mechanizmem reakcji Ugiego jedynym produktem ubocznym jest cząsteczka wody. Usuwanie lub wiązanie powstającej w procesie wody może powodować przesunięcie równowagi reakcji w kierunku tworzenia produktu, wpływając jednocześnie na wzrost wydajności. Efekt ten można osiągnąć poprzez dodatek do mieszaniny reakcyjnej czynnika suszącego lub poprzez wytworzenie w mieszaninie efektu hydrofobowego poprzez dodatek czynnika wysalającego.^{10,187} Niekiedy zamiana rozpuszczalnika organicznego stosowanego w reakcji Ugiego na wodę może również powodować wzrost szybkości reakcji.¹⁰

Czas reakcji skrócono z 7 do 3 dni. W reakcji bez dodatków wydajność reakcji spadła z 77 do 55% (Tabela 14, L.p. 1). Dodatek bezwodnego siarczanu magnezu jako czynnika suszącego (wiążącego wodę) nie wywoływał oczekiwanego efektu i powodował nieznaczny spadek wydajności do 49% (L.p. 2). Z kolei nasycenie etanolu chlorkiem sodu wywołujące efekt hydrofobowy powodowało wzrost wydajności reakcji do 64% (L.p. 3). Następnie etanol zastąpiono wodą i sprawdzono różne warianty dodanego chlorku sodu na wydajność reakcji. Stwierdzono, że zastosowanie wody jako rozpuszczalnika powoduje znaczne obniżenie wydajności do 30% (L.p. 4). Mogło to być spowodowane niską rozpuszczalnością substratów oraz utrudnionym wydzieleniem produktu na drodze ekstrakcji z mieszaniny reakcyjnej. Zastąpienie wody roztworami chlorku sodu powodowało dalszy spadek wydajności, który był tym wyższy im wyższe stężenie chlorku sodu było zastosowane (L.p. 5 i 6).

Tabela 14. Wydajności reakcji Ugiego z zastosowaniem paraformaldehydu w różnych układach rozpuszczalników.

L.p.	Układ rozpuszczalnika	Wydajność [%]
1	EtOH (2 ml)	55
2	EtOH (2 ml) + Na ₂ SO ₄ (50 mg)	49
3	EtOH (2 ml) + NaCl _{nas.}	64
4	H ₂ O (2 ml)	30
5	H ₂ O, NaCl (2 ml, 2 M)	28
6	H ₂ O, NaCl _{nas.} (2 ml, ~8.5 M)	22

Wyniki wskazują, że lepszym rozpuszczalnikiem w reakcji Ugiego jest etanol, a dodatek soli wywołującej efekt hydrofobowy w mieszaninie powoduje wzrost wydajności. Obecność wody w mieszaninie reakcyjnej wyraźnie powoduje spadek wydajności, zarówno w reakcjach w których zastępowała rozpuszczalnik organiczny (Tabela 14) jak i w reakcjach w których formaldehyd stosowany był w formie wodnego roztworu czyli formaliny (Tabela 13).

Pomimo, że synteza związku **107a** była faworyzowana poprzez nasycenie rozpuszczalnika organicznego chlorkiem sodu, w analogicznych warunkach z zastosowaniem innego kwasu (*N*-benzyloksykarbonyloglicyna (**2**)) powstawały produkty uboczne, których obecność utrudniała wydzielenie głównego produktu i powodowała obniżenie wydajności reakcji. Dlatego też w kolejnych reakcjach jako rozpuszczalnik stosowano etanol bez dodatku soli.

Kolejnym etapem było zastosowanie reakcji Ugiego do syntezy peptoidów zawierających grupy fluoroforowe. Związki tego typu są stosowane między innymi do znakowania protein oraz badania szlaków transportu wewnątrzkomórkowego.¹⁸⁸ Grupy fluoroforowe wprowadzono do struktur peptoidów poprzez zastosowanie do reakcji Ugiego kwasów karboksylowych w postaci kwasów glutaramowych (monoamidów kwasu glutarowego) **110a-h** otrzymanych w reakcjach bezwodnika glutarowego (**108**) z odpowiednimi aminami aromatycznymi **53d** i **109a-g** (Schemat 45). Otrzymano w ten sposób 8 pochodnych z grupami aromatycznymi, z wydajnościami mieszczącymi się w zakresie 57 - 87% (Tabela 15).

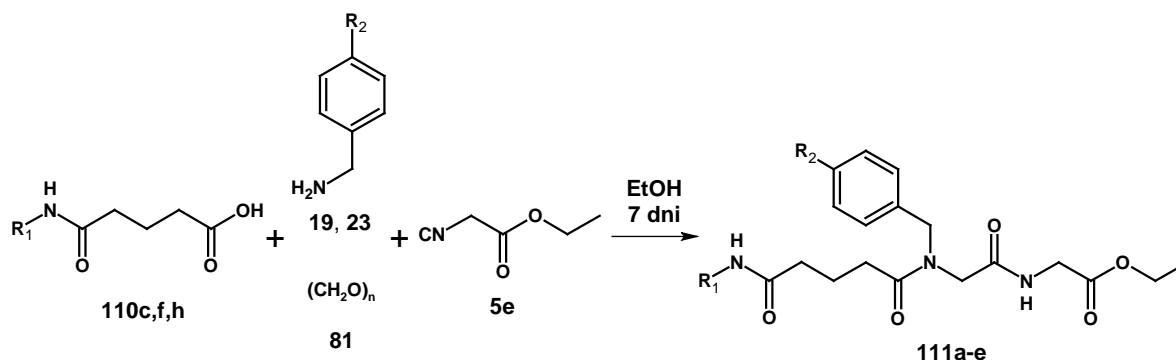


Schemat 45. Synteza kwasów glutaramowych **110a-h**.

Tabela 15. Wydajności reakcji syntezy kwasów glutaramowych **110a-h**.

L.p.	Amina	R	Produkt	Wydajność [%]
1	109a	1-naftył	110a	82
2	109b	2-naftył	110b	87
3	109c	2-fluorenył	110c	80
4	109d	2-pirydynyl	110d	57
5	109e	8-chinolinyl	110e	68
6	109f	1-pirenył	110f	64
7	109g	1-pirenyłometyl	110g	67
8	53d	fenył	110h	81

Do syntezy peptoidów z grupami fluoroforowymi na drodze reakcji Ugiego wykorzystano trzy wybrane kwasy glutaramowe. Były to pochodne 2-fluorenylowa **110c**, 1-pirenylowa **110f** oraz fenyłowa **110h**. W celu sprawdzenia wpływu struktury tych kwasów karboksylowych na wydajność reakcji multikomponentowej, syntezy prowadzono w warunkach identycznych do warunków reakcji, których wyniki przedstawione są w Tabeli 12 (etanol bez dodatków soli, 7 dni). W reakcjach stosowano paraformaldehyd (**81**) oraz benzyloaminę (**23**) lub 4-metoksybenzyloaminę (**19**) i izocyjanek **5e** (Schemat 46). W reakcjach Ugiego z kwasami **110h** (Tabela 16, L.p. 1 i 2, R₁ = fenył) i **110c** (L.p. 3 i 4,



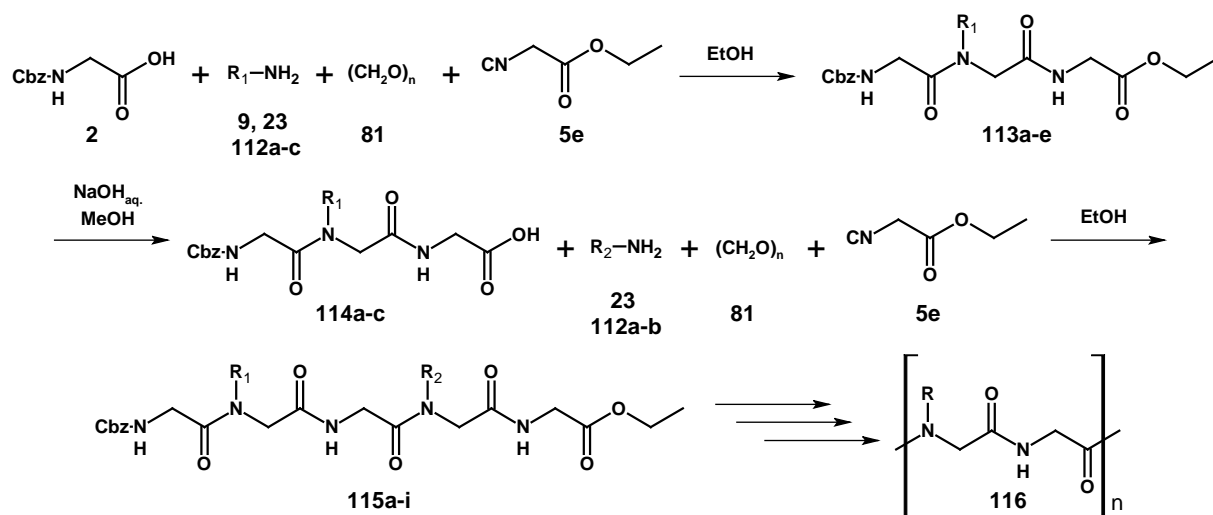
Schemat 46. Synteza peptoidów **111** z zastosowaniem kwasów glutaramowych **110**.

$\text{R}_1 = 2\text{-fluorenyl}$) otrzymano produkty **111a-d** z wydajnościami zbliżonymi do wartości 70%. Wydajności nie były zależne od rodzaju użytej do reakcji aminy tak jak miało to miejsce w syntezie związków **107a** i **107c** (Tabela 12). Produktu nie otrzymano natomiast w reakcji z zastosowaniem pochodnej 1-pirenylowej **110f**. Wynikało to z braku rozpuszczalności tego reagenta. Rozpuszczalności kwasu **110f** nie udało się zwiększyć poprzez dodatek innych rozpuszczalników (DCM, DMF, THF). Należy zatem zwrócić uwagę na fakt, że problemem limitującym wydajność syntezy peptoidów w reakcji Ugiego jest rozpuszczalność reagentów. Ma to miejsce w przypadku opisanym powyżej z zastosowaniem pochodnej pirenowej **110f** jako kwasu karboksylowego oraz w przypadku stosowania jako reagenta karbonylowego 1,3,5-trioksanu.

Tabela 16. Wyniki syntezy peptoidów **111** z zastosowaniem kwasów glutaramowych **110**.

L.p.	Kwas	R_1	Amina	R_2	Produkt	Wydajność [%]
1	110h	fenyl	23	H	111a	72
2			19	OMe	111b	65
3	110c	2-fluorenyl	23	H	111c	70
4			19	OMe	111d	70
5	110f	1-pirenyl	19	OMe	111e	0

W ostatnim etapie tej części badań metodę syntezy peptoidów na drodze reakcji Ugiego wykorzystano do otrzymania grupy *N*-podstawionych oligoglicyn. Ogólne podejście do syntezy tego typu związków polega na powtarzanej sekwencji (a) reakcji Ugiego z izocyjankiem **5e** posiadającym grupę estrową kwasu karboksylowego, oraz (b) reakcji hydrolizy C-końcowej grupy estrowej prowadzącej do uwolnienia grupy karboksylowej, która w kolejnym etapie wchodzi w reakcję jako reagent kwasowy następnej reakcji Ugiego. W pierwszej serii reakcji Ugiego zastosowano pięć amin: benzyloaminę (**23**), *n*-butyloaminę (**112a**), *i*-butyloaminę (**112b**), *s*-butyloaminę (**112c**) oraz alliloaminę (**9**). Otrzymano pięć produktów w postaci estrów etylowych *N*-benzyloksykarbonyloglicyloglicyloglicyny **113a-e** podstawionych na jednym z wiązań amidowych (Schemat 47) (Tabela 17). W reakcjach z benzyloaminą, *n*-butyloaminą i *i*-butyloaminą produkty **113a-c** otrzymano z wysokimi



Schemat 47. Wykorzystanie reakcji Ugiego do syntezy oligomerycznych peptoidów **115**.

wydajnościami mieszczącymi się w zakresie 82 – 89%. W przypadku reakcji z *s*-butyloaminą oraz alliloaminą produkty **113d** i **113e** otrzymano z wydajnościami niższymi, odpowiednio 62 i 23%. Produkty **113a-c** otrzymane z najwyższymi wydajnościami poddano dalszej funkcjonalizacji. Przeprowadzono hydrolizę C-końcowych grup estrowych i otrzymano trzy związki **114a-c** z wolnymi grupami karboksylowymi (Schemat 47). Kwasy **114a-c** zastosowano następnie do kolejnych reakcji Ugiego z aminami, z którymi peptoidy **113** otrzymano z najwyższymi wydajnościami. W rezultacie otrzymano grupę dziewięciu pentapeptoidów z dwoma podstawionymi grupami amidowymi **115a-i** (Schemat 47). Produkty te otrzymano z wydajnościami 42 – 87%, przy czym większość z nich przekraczała wartość 65% (Tabela 17).

Tabela 17. Wyniki syntezy peptoidów **113** i **115** otrzymanych na drodze powtarzanej reakcji Ugiego.

L.p.	Amina	R ₁	Produkt r. Ugiego 1	Wyd. r. Ugiego 1 [%]	Produkt hydrolizy	Wydajność hydrolizy [%]	Amina	R ₂	Produkt r. Ugiego 2	Wyd. r. Ugiego 2 [%]
1							23	Bn	115a	71
2	23	Bn	113a	89	114a	100	112a	<i>n</i> -Bu	115b	42
3							112b	<i>i</i> -Bu	115c	67
4							23	Bn	115d	73
5	112a	<i>n</i> -Bu	113b	87	114b	91	112a	<i>n</i> -Bu	115e	83
6							112b	<i>i</i> -Bu	115f	65
7							23	Bn	115g	87
8	112b	<i>i</i> -Bu	113c	82	114c	77	112a	<i>n</i> -Bu	115h	75
9							112b	<i>i</i> -Bu	115i	75
10	112c	<i>s</i> -Bu	113d	62						
11	9	allil	113e	23						

W części tej zaprezentowano możliwości zastosowania reakcji Ugiego do syntezy peptoidów z zastosowaniem różnych kwasów karboksylowych w tym pochodnych z grupami

fluoroforowymi. Przedstawiona metoda syntezy peptoidów pozwala otrzymać w prosty sposób związki o strukturze *N*-alkilowanych oligoglicyn posiadających podstawione co drugie wiązanie amidowe. Podstawniki można dowolnie dobierać poprzez zastosowanie odpowiednich amin jako reagentów reakcji Ugiego. Dalsze powtarzanie sekwencji reakcji doprowadziłoby do otrzymania oligopeptoidów **116**, których struktura przedstawiona została na Schemacie 47.

Opracowana metoda syntezy peptoidów z zastosowaniem reakcji Ugiego jest konkurencyjna do metod klasycznych, a główną jej zaletą jest zmniejszenie ilości etapów budowy szkieletu oligoglicynowego. Ponadto, poszczególne etapy wydłużające szkielet peptoidowy nie wymagają stosowania skomplikowanych i kosztownych reagentów sprzęgających jak ma to miejsce w przypadku syntezy klasycznej.

7. Wnioski

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki badań nad opracowaniem nowej, nieklasycznej metody syntezy tripeptydów z C-kończącą grupą aldehydową z zastosowaniem reakcji Ugiego. Porównano kilka równoległych ścieżek modelowej syntezy tego typu związków z wykorzystaniem różnych izocyjanów z ugrupowaniami będącymi prekursorami grupy aldehydowej. Ścieżkę, w której otrzymano produkt z najwyższą wydajnością przystosowano do syntezy znanego inhibitora proteasomów – MG-132 (*S,S,S*)-**1**, oraz rozszerzono do syntezy wszystkich stereoizomerów tego związku w postaci diastereoizomerycznie czystej.

Zgodnie z wymogami metody opracowano również strukturę izocyjanów (*S*)- i (*R*)-**45**, które nie racemizowały w warunkach syntezy, przechowywania oraz w warunkach reakcji Ugiego. Umożliwiło to otrzymanie w reakcjach Ugiego mieszanin wyłącznie dwóch diastereoizomerów. Rozdział składników tych mieszanin był możliwy z wykorzystaniem metod chromatograficznych.

Badania biologiczne otrzymanej grupy ośmiu stereoizomerów związku Cbz-Leu-Leu-Leu-al (**1**) wykazały ogromny wpływ konfiguracji absolutnych na aktywność tych związków. Wykazano, że stereoizomery zawierające aminokwasy o nienaturalnej konfiguracji jako inhibitory proteasomów posiadały zarówno wyższą aktywność ((*S,R,S*)-(-)-**1**) jak i selektywność ((*S,I,R*)-(-)-**1**) niż stereoizomer (*S,S,S*)-**1** (Tabela 9). Wskazuje to na wyraźną zależność aktywności tych związków od ich struktury. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w wielu badaniach problem stereochemii poszczególnych związków (głównie peptydowych) lub ich mieszanin jest rzadko poruszany. Jestem przekonany, że zaprezentowane w tej części pracy wyniki badań są dobrym punktem wyjścia do syntezy kolejnych grup związków o strukturze peptydów posiadających dowolną konfigurację absolutną na centrach stereogenicznych. Badania takie mogłyby owocować w wyniki bardzo atrakcyjne z punktu widzenia chemii medycznej.

Opracowaną metodologię zastosowano także do syntezy aldehydów tripeptydowych z różnymi grupami zabezpieczającymi jedno z wiązań peptydowych. Otrzymano również tripeptydy z α,α -dipodstawionymi aminokwasami oraz z innymi niż aldehydowa grupami C-kończącymi, a także aldehydy dipeptydowe z niepeptydowymi grupami N-kończącymi w tym pochodne indolowe. Wykazano w ten sposób możliwość szerokiego zastosowania reakcji Ugiego do syntezy różnych analogów związków peptydowych.

W dalszej części badań zbadano wpływ formy formaldehydu, stosowanego jako reagent formylowy w reakcji Ugięgo, na wydajność syntezy peptoidów o strukturze *N*-alkilowanych oligoglicyn. Stwierdzono, że formą odpowiednią w syntezie tego typu związków jest paraformaldehyd. Metodę syntezy peptoidów z zastosowaniem reakcji multikomponentowej wykorzystano do syntezy związków z *N*-końcowymi grupami fluoroforowymi oraz grupy pentapeptoidów z różnymi podstawnikami na atomach azotu w wiązaniach amidowych. Wykazano w ten sposób możliwość syntezy związków tego typu z zastosowaniem metody konkurencyjnej do metod klasycznie stosowanych.

8. Część eksperymentalna

8.1. Uwagi wstępne

Widma NMR zostały wykonane na aparatach Varian Gemini 200 (200 MHz), Varian Gemini 400 (400 MHz) oraz Bruker DMX 500 Avance (500 MHz). Widma rejestrowano z TMS jako wzorcem wewnętrznym. Przesunięcia sygnałów (δ) podano w ppm, a stałe sprzężenia (J) w hercach (Hz). Sygnały w widmach protonowego jądrowego rezonansu magnetycznego zostały przypisane dla wybranych związków. Widma masowe wysokiej rozdzielczości zarejestrowano na aparacie API 365 (SCIEX). Widma IR zarejestrowano na aparacie Perkin Elmer FT-IR Spectrum 2000. Pomiary skręcalności właściwej zostały wykonane na polarymetrach Jasco DIP-360 oraz Jasco P-2000 przy długości fali $\lambda = 589$ nm, przy użyciu kuwety o długości 1.0 dm i pojemności 1.2 ml. Analizy elementarne wykonano w Pracowni mikroanalizy PAN, używając aparatów Perkin Elmer 240 Elemental Analyzer oraz Heraeus Vario EL III. Analizy HPLC przeprowadzono na aparacie z pompą Merck Hitachi L-7100 LACHROM, z detektorem UV WATERS 486, na kolumnie Kromasil 100 C18, $l = 230$ nm:

Metoda A. Eluent: metanol/woda 85:15 (v/v) z przepływem 1,0 ml/min.

Metoda B. Eluent: metanol/woda 80:20 (v/v) z przepływem 1,2 ml/min.

Metoda C. Eluent: metanol/woda 83:17 (v/v) z przepływem 1,0 ml/min.

Metoda D. Eluent: metanol/woda 80:20 (v/v) z przepływem 1,0 ml/min.

Do analiz TLC używano płytek aluminiowych pokrytych Kieselgel 60 F₂₅₄ firmy Merck. Do preparatywnego rozdzielania i oczyszczania produktów za pomocą chromatografii cienkowarstwowej używano płytek PTLC pokrytych Kieselgel 60 F₂₅₄ o grubości 0,25 mm firmy Merck. Oczyszczanie związków za pomocą chromatografii kolumnowej wykonywano używając żelu krzemionkowego Kieselgel 60 (60 mesh, 70-230 mesh i 230-400 mesh) firmy Merck.

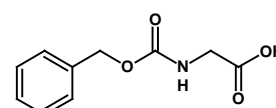
Wykorzystywane reagenty były komercyjnie dostępne, natomiast przy związkach niekomercyjnych podano sposób ich otrzymania. Używane w reakcjach rozpuszczalniki były czystości analitycznej. Jako eluenty do chromatografii kolumnowej i analiz HPLC stosowano heksan, octan etylu, chloroform, metanol oraz wodę, które wcześniej oczyszczono przez destylację. Pozostałe rozpuszczalniki reagenty oczyszczano według ogólnych metod literaturowych.¹⁸⁹

Proszki acetonowe z tkanek zwierzęcych otrzymano zgodnie z procedurą opisaną w literaturze.¹⁹⁰ Lipazę Amano PS zakupiono od firmy Amano. Lipazy z trzustyki wieprzowej, kielków pszenicy (wheat germ) i esterazy z wątroby świńskiej (PLE) zakupiono od firmy Sigma. Novozym 435 (lipaza z *Candida antarctica*, typ B) zakupiono od firmy Novo Nordisk. Lipazy z *Candida lipolytica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus arrhizus*, *Candida cylindracea* oraz pozostałe enzymy zakupiono od firmy Fluka.

8.2. Synteza α -aminokwasowych karboksylowych reagentów reakcji Ugiego

Cbz-Gly-OH: kwas (((benzyloksy)karbonylo)amino)octowy (2):

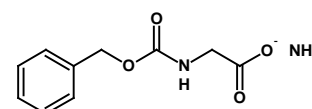
Do roztworu glicyny (3 g, 40 mmol) w wodnym roztworze wodorotlenku sodu (2 M, 30 ml) wkraplano równolegle



chloromrówczan benzylu (6.85 ml, 48 mmol) i wodny roztwór wodorotlenku sodu (2M, 30 ml). Podczas wkraplania temperatura wzrosła do 50 °C. Po 16 godzinach dodano roztwór kwasu solnego (2 M) do osiągnięcia pH = 2 i ekstrahowano octanem etylu (2 × 70 ml). Fazy organiczne połączono i zatężono otrzymując biały osad. Osad krystalizowano z układu EtOAc/heksan. Wydajność 83%; 6.98 g (33 mmol) białych kryształów; t.t. 117-120 °C (lit.¹⁹¹ 120).

Cbz-glicynian amonu: Benzyloksykarbonyloaminooctan amonu (2a):

Mieszaninę Cbz-glicyny (2) (1.05 g, 5 mmol) i wodnego roztworu amoniaku (7 ml, 30 mmol, 4.2 M) mieszano przez 30 minut. Mieszaninę odparowano do suchej masy i wysuszono pod zmniejszonym



ciśnieniem otrzymując produkt. Wydajność 100%, 1.12 g (5 mmol) białego osadu; t.t. 125-126 °C; Analiza elementarna: obliczona dla C₁₀H₁₄N₂O₄: C, 53.09; H, 6.24; N, 12.38; zbadana: C, 52.88; H, 6.35; N, 12.20.

Synteza enancjomerów (S)- i (R)- kwasu Cbz-Leu-OH

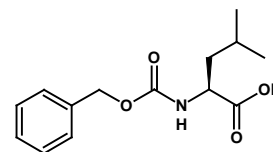
Procedura ogólna 1: Do schłodzonego do 0 °C roztworu leucyny (1.312 g, 10 mmol) w wodnym roztworze wodorotlenku sodu (5 ml, 2 M) dodawano jednocześnie porcjami chloromrówczan benzylu (1.43 ml, 10 mmol) i wodny roztwór wodorotlenku sodu (5 ml, 2 M). Po 4 godzinach dodano wodny roztwór kwasu solnego (2 M) do osiągnięcia pH = 2, a następnie ekstrahowano octanem etylu (3 × 15 ml). Fazy organiczne zebrano i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość

wysuszono na pompie olejowej otrzymując produkt w postaci bezbarwnego oleju, który stosowano w kolejnych reakcjach bez dalszego oczyszczania.

Cbz-L-Leu-OH: kwas (2S)-benzyloksykarbonyloamino-4-metylopentanowy ((S)-38):

Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 1**: Wydajność 87%;

2.31 g (8.7 mmol) bezbarwnego oleju; $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 0.80-1.00 (m, 6H), 1.45-1.80 (m, 3H), 5.11 (s, 2H), 5.24 (d, $J=9.0$ Hz,

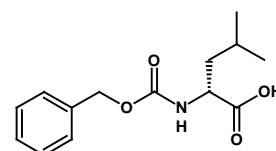


1H), 7.34 (s, 5H), 9.14 (br s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 22.0, 23.2, 25.1, 41.8, 52.7, 67.5, 128.4, 128.5, 128.8, 156.5, 178.3; $[\alpha]_D^{22} = -15.5$ (c 2.0, EtOH), (lit.¹⁹² -16.7 (c 2.0, EtOH)).

Cbz-D-Leu-OH: kwas (2R)-benzyloksykarbonyloamino-4-metylopentanowy ((R)-38):

Produkt otrzymano zgodnie z

Procedurą ogólną 1: Wydajność 88%; 2.33 g (8.8 mmol) bezbarwnego oleju; $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 0.80-1.00 (m, 6H),

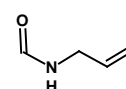


1.45-1.80 (m, 3H), 5.11 (s, 2H), 5.25 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.34 (s, 5H), 9.14 (br s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 22.0, 23.2, 25.2, 41.8, 52.8, 67.5, 128.4, 128.5, 128.8, 156.6, 178.2; $[\alpha]_D^{22} = +15.2$ (c 2.0, EtOH), (lit.¹⁹³ $+14.7$ (c 2.0, MeOH)).

8.3. Synteza izocyjnaków achiralnych 5a-5d

Synteza izocyjanku 5a

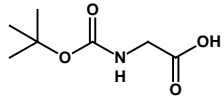
N-Alliliformamid (10): Mieszaninę alliloaminy (10.0 ml, 133 mmol) i mrówczanu etylu (12.9 ml, 160 mmol) ogrzewano do temperatury 85 °C przez 48 godzin. Mieszaninę zatężono. Produkt wydzielono za pomocą destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 87%; 9.9 g (116 mmol) bezbarwnego oleju; t. wrz. 80 °C (0.4 mmHg) (lit.¹⁹⁴ 109 (15)); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 3.75-3.97 (m, 2H), 5.05-5.32 (m, 2H), 5.70-6.30 (m, 2H), 8.21 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 40.8, 117.1, 133.8, 161.3.

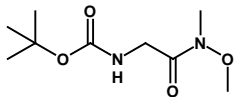


3-Izocyjanoprop-1-en: izocyjanek allilowy (5a): Do podgrzanego do temperatury 45 °C wodnego roztworu wodorotlenku sodu (60 ml, 50 %) wkraplano przez 20 minut mieszaninę alliloaminy (11.4 g, 152 mmol), chloroformu (11.7 g, 146 mmol), chlorku trietylobenzyloamoniowego (0.2 g, 0.9 mmol) i dichlorometanu (30 ml). Mieszaninę ogrzewano do temperatury 45 °C i intensywnie mieszano przez kolejne 3 godziny. Następnie mieszaninę reakcyjną ekstrahowano dichlorometanem (2 × 50 ml). Fazy organiczne połączono i przemyto wodą (30 ml). Produkt wydzielono z zastosowaniem destylacji

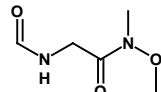
frakcyjnej. Wydajność 65%; 6.6 g (99 mmol) bezbarwnego oleju o intensywnym, nieprzyjemnym zapachu; t. wrz. 90 °C (atm.) (lit.¹⁵⁶ 98).

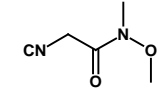
Synteza izocyjanku 5b

***N*-Boc-glicyna: Kwas *N*-*tert*-butoksykarbonyloaminooctowy (11):** Do roztworu wodorotlenku sodu (0.572 g, 14.3 mmol) w wodzie (15 ml)  dodano glicynę (0.96 g, 13.0 mmol) i alkohol *tert*butylowy (10 ml). Do mieszaniny w temperaturze pokojowej wkraplano przez 20 minut bezwodnik *tert*-butoksykarbonylowy (2.90 g, 13.0 mmol). Podczas wkraplania temperatura wzrosła do 30 °C. Po 16 godzinach mieszaninę przemyto heksanem (2 × 40 ml), fazy organicznie połączono i ekstrahowano nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (2 × 40 ml). Zebrane fazy wodne połączono, dodano wodny roztwór wodorosiarczanu potasu (10%) do osiągnięcia pH = 2-3 i ekstrahowano eterem etylowym (4 × 40 ml). Fazy organiczne połączono, wysuszono (Na₂SO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując gęsty bezbarwny olej. Olej rozpuszczono w EtOAc, dodano heksan i zatężono. Po odparowaniu rozpuszczalnika i wysuszeniu pod zmniejszonym ciśnieniem olej wykryształował w postaci białych kryształów produktu, który użyto do dalszej reakcji bez oczyszczania. Wydajność 83%; 1.9 g (10.8 mmol); t.t. 84 – 86 °C (lit.¹⁹⁵ 87-88). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.46 (s, 9H, (CCH₃)₃), 3.95 (s, 2H, CH₂), 6.84 (s, 1H, NH), 10.24 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 28.6, 42.6, 80.8, 156.3, 175.1; IR (film w CHCl₃) ν_{max}: 3315, 2913, 2847, 1617, 1571, 1532, 1434, 1310, 1241, 1068, 1044 cm⁻¹.

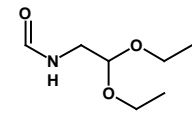
Karbaminian *tert*-butylo-2-metoksymetyloamino-2-oksoetylowy (12):  Do roztworu chlorowodoru *N,O*-dimetylohydroksyloaminy (0.585 g, 6.0 mmol) w dichlorometanie (30 ml) w temperaturze 0 °C dodano trietyloaminę (0.92 ml, 6.6 mmol) i *N*-Boc-glicynę (11) (0.876 g, 5.0 mmol). Po 30 minutach dodano dicykloheksylokarbodiimid (1.15 g, 5.5 mmol) i 4-dimetyloaminopirydynę (20 mg). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 0 °C przez 2 godziny, a następnie w temperaturze pokojowej przez 16 godzin. Wytrącony biały osad dicykloheksyloamocznika oraz chlorowodoru trietyloaminy (t.t. 230-235 °C) odsączono i przemyto octanem etylu. Przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Wytrącony w trakcie zatężania biały osad produktu odsączono, czynność powtórzono trzykrotnie otrzymując produkt, który użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 82%, 0.899 g (4.1 mmol) białego osadu; t.t. 95 – 98 °C (lit.¹⁵⁹ 102-103); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.46 (s, 9H, (CCH₃)₃),

3.21 (s, 3H, CH₃), 3.72 (s, 3H, CH₃), 4.08 (d, *J*=4.8 Hz, 2H, CH₂), 5.30 (br s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 28.7, 32.7, 42.0, 61.7, 79.9, 156.1, 175.0.

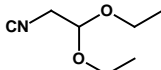
2-Formyloamino-*N*-metoksy-*N*-metyloacetamid (13): Roztwór karbaminianu *tert*-butylo-2-metoksymetyloamino-2-oksoetylowego (**12**) (0.785 g, 3.60 mmol)  w kwasie mrówkowym (10 ml) ogrzewano do temperatury wrzenia przez 1.5 godziny. Nadmiar kwasu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w mrówczanie etylu (5 ml), dodano trietyloaminę (1.05 ml, 7.56 mmol) i ogrzewano do temperatury wrzenia przez 16 godzin. Mieszaninę zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, rozcieńczono wodą (20 ml) i ekstrahowano dichlorometanem (4 x 20 ml). Fazy organiczne połączono, wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując produkt, który użyto w kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 53%; 0.278 g (1.9 mmol) bezbarwnego oleju; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 3.24 (s, 3H, CH₃), 3.74 (s, 3H, CH₃), 4.25 (d, *J*=4.4 Hz, 2H, CH₂), 6.70 (br s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, CHO).

2-Izocyjano-*N*-metoksy-*N*-metyloacetamid (5b): Roztwór 2-formyloamino-*N*-metoksy-*N*-metyloacetamidu (**13**) (0.278 g, 1.9 mmol) w dichlorometanie (15 ml)  ochłodzono do temperatury -50 °C, dodano trietyloaminę (0.800 ml, 5.7 mmol) i wkraplano tlenochlorek fosforu (0.260 ml, 2.85 mmol) przez 30 minut. Mieszaninę ogrzano do temperatury pokojowej, mieszano przez 2 godziny, ochłodzono do temperatury 0 °C, rozcieńczoną wodą (10 ml) i dodano schłodzony do temperatury 0 °C wodny roztwór wodorowęglanu sodu (20 ml, 1 M). Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (3 × 20 ml), fazy organiczne połączono, wysuszono (MgSO₄) i rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 75:25). Wydajność 53%; 130 mg (1.01 mmol) kremowego osadu; t.t. 77-79 °C (lit.¹⁵⁹ 85-86); *R*_f = 0.26 (heksan/EtOAc, 5:5); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 3.24 (s, 3H, CH₃), 3.73 (s, 3H, CH₃), 4.40 (s, CH₂); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 32.7, 44.0, 62.5, 160.9, 164.0; IR (film w CHCl₃) *v*_{max}: 3336, 2994, 2957, 2163, 1682, 1467, 1406, 1328, 1200, 1011, 961, 916, 615, 556 cm⁻¹.

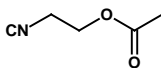
Synteza izocyjanku 5c

***N*-(2,2-Dietoksyetylo)formamid (15):** Mieszaninę 2,2-dietoksyetyloaminy  (10 ml, 69 mmol) i mrówczanu etylu (6.7 ml, 83 mmol) ogrzewano do temperatury wrzenia przez 48 godzin. Nadmiar mrówczanu etylu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą destylacji pod zmniejszonym

ciśnieniem. Wydajność 83%; 9.21 g (57 mmol) bezbarwnego oleju; t. wrz. 80 °C (0.4 mmHg) (lit.¹⁶⁰ 110-111 (0.5)); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) (widma NMR wykazały obecność dwóch rotamerów): główny rotamer δ 1.16 (t, *J*=7.1 Hz, 6H), 3.38 (t, *J*=5.4 Hz, 2H), 3.44-3.90 (m, 4H), 4.47 (t, *J*=5.4 Hz, 1H), 6.18 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H); poboczny rotamer δ 3.25 (dd, *J*=5.5 Hz, *J*=6.5 Hz, 2H), 4.39 (t, *J*=5.2 Hz, 1H), 7.99 (d, *J*=13.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): główny rotamer δ 15.5, 40.7, 63.1, 100.7, 161.5; poboczny rotamer δ 44.9, 63.6, 101.9, 165.2; Analiza elementarna: obliczona dla C₇H₁₃NO₂: C, 58.72; H, 9.15; N, 9.78; zbadana: C, 58.75; H, 9.10; N, 9.75.

1,1-Dietoksy-2-izocyjanoetan (5c): Mieszaninę *N*-(2,2-dietoksyetylo) formamidu (**15**) (5 g, 31 mmol), trietyloaminy (4.3 ml, 31 mmol), , trifenylfosfiny (9.18 g, 35 mmol), tetrachlorku węgla (3.2 ml, 33 mmol) i dichlorometanu (30 ml) ogrzewano do temperatury wrzenia przez 3.5 godziny. Mieszaninę schłodzono w do temperatury 5 °C. Po 15 minutach odsączono osad (celit) i przemyto go eterem etylowym (20 ml). Składniki lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozdrobniono i dodano dodano eter etylowy (20 ml) i pentan (20 ml) otrzymując zawiesinę, którą pozostawiono na 16 godzin w temperaturze -20 °C. Osad odsączono i przemyto pentanem (30 ml). Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą destylacji zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 79%; 3.517 g (25.4 mmol) bezbarwnego oleju; t. wrz. 45 °C (0.5 mmHg) (lit.¹⁶⁰ 60-61 (1.0)) bezbarwnego oleju; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.20 (t, *J*=7.2 Hz, 6H), 3.46 (d, *J*=5.6 Hz, 2H), 3.50-3.90 (m, 4H), 4.67 (t, *J*=5.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 15.3, 44.7, 44.8, 45.0, 63.4, 99.7.

Synteza izocyjanku 5d

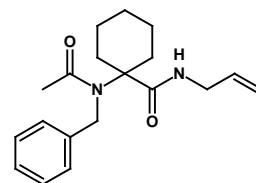
Octan-2-izocyjanoetylu (5d): Mieszaninę 2-aminoetanolu (10 ml, 166 mmol)  i mrówczanu etylu (30 ml, 370 mmol) ogrzewano do temperatury wrzenia przez 3 godziny. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej, składniki lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując *N*-(2-hydroksyetylo)formamid (15 g), który użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Do produktu dodano bezwodnik kwasu octowego (30 ml, 32 mmol). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano do temperatury wrzenia przez 5 godzin, następnie ochłodzono do temperatury pokojowej i składniki lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując octan 2-formamidoetylu (**17**) (21 g) w postaci bezbarwnego oleju, który użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Część otrzymanego związku **17** (3 g, 23 mmol) rozpuszczono w dichlorometanie (30 ml) i dodano trietyloaminę (16 ml, 115 mmol). Mieszaninę schłodzono do temperatury -60 °C i wkraplano

tlenochlorek fosforu (2.5 ml, 27.6 mmol) przez 30 minut. Mieszanę reakcyjną mieszano podnosząc temperaturę do temperatury pokojowej, w której reakcję prowadzono przez kolejne 2 godziny. Mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem. Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (3 × 30 ml). Fazy organiczne połączono, przemyto solanką (50 ml), wysuszono (MgSO₄) i rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt **5d** wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, 60 mesh, dichlorometan). Wydajność całkowita 50%; 1.35 g (11.9 mmol) żółtego oleju; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 3.55-3.65 (m, 2H, CH₂O), 4.15-4.25 (m, 2H, CH₂N); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 41.0, 61.4, 97.4, 170.7; IR (film) ν_{max}: 2960 (CH₃), 2150 (N≡C), 1740 (C=O), 1225 (CH₂-O) cm⁻¹.

8.4. Modelowe reakcje Ugiego z izocyjankiem allilowym (5a)

1-[Acetylo(benzylo)amino]-N-allilocykloheksanokarboksyamid (25):

Metoda A: Mieszaninę benzyloaminy (111 mg, 1.04 mmol), cykloheksanonu (103 mg, 1.05 mmol), kwasu octowego (63 mg, 1.04 mmol), izocyjanku allilowego (79 mg, 1.17 mmol) i dichlorometanu (1 ml) ogrzewano do temperatury 40 °C przez 10 godzin. Rozpuszczalnik



odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (70-230 mesh, heksan:EtOAc, 7:3). Wydajność 63%; 209 mg (0.66 mmol) bezbarwnego oleju; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.25-1.40 (m, 1H), 1.45-1.85 (m, 7H), 2.18 (s, 3H), 2.54 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 3.96 (t, *J*=5.4 Hz, 2H), 4.73 (s, 2H), 5.15-5.40 (m, 2H), 5.80-6.05 (m, 1H), 6.59 (br s, 1H), 7.25-7.55 (m, 5H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 23.3, 24.5, 25.7, 33.3, 42.5, 49.2, 66.5, 67.4, 116.5, 126.2, 127.5, 129.1, 134.8, 138.8, 173.6; Analiza elementarna obliczona dla C₁₉H₂₆N₂O₂: C, 72.58; H, 8.33; N, 8.91; zbadana: C, 72.46; H, 8.29; N, 8.98.

Metoda B: Mieszaninę benzyloaminy (111 mg, 1.04 mmol), cykloheksanonu (1 ml, 9,6 mmol), kwasu octowego (63 mg, 1.04 mmol) i izocyjanku allilowego (78 mg, 1.16 mmol) ogrzewano do temperatury 40 °C przez 10 godzin. Składniki lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (70-230 mesh, heksan:EtOAc, 7:3). Wydajność 17%; 58 mg (0.18 mmol) bezbarwnego oleju; Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Metoda C: Mieszaninę benzyloaminy (109 mg, 1.02 mmol), cykloheksanonu (102 mg, 1.04 mmol), kwasu octowego (62 mg, 1.04 mmol), izocyjanku allilowego (80 mg, 1.18 mmol)

ogrzewano do temperatury 40 °C przez 10 godzin. Składniki lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (70-230 mesh, heksan:EtOAc, 7:3). Wydajność 45%; 145 mg (0,46 mmol) bezbarwnego oleju; Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

8.5. Modelowa synteza aldehydu 27 i jego pochodnych z zastosowaniem reakcji Ugiiego z izocyjankami 5a-5e

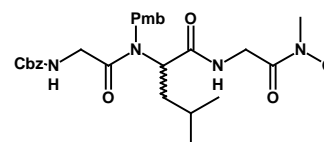
Procedura ogólna 3 (reakcja Ugiiego): Do roztworu aldehydu (1 eq., 1 M) w metanolu (lub etanolu jeśli w reakcji stosowany był izocyjanek z grupą estru etylowego 5e lub acetalu dietylowego 5c) dodano aminę (1 eq.) i mieszano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodano kwas karboksylowy (1 eq.) i po kolejnych 15 minutach dodano izocyjanek (1 eq.). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 dni, rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej w gradiencie układów rozpuszczalników (żel krzemionowy, 70-230 mesh, heksan/EtOAc).

8.5.1. Reakcje Ugiiego z izocyjankami 5a-5e

N-Benzyloksykarbonyloaminoocetan p-metoksybenzyloamoniowy (21): Związek otrzymano jako produkt uboczny w reakcji prowadzonej zgodnie z **Procedurą ogólną 3** z zastosowaniem izocyjanku 5a. Produkt 21 wytrącał się z mieszaniny reakcyjnej w postaci białych kryształów. Produkt odsączono, przemyto metanolem i wysuszono. Wydajność 55%, 190 mg (0.55 mmol) białych kryształów; t.t. 134–137 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 3.73 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 4.02 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.96 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.20–7.40 (m, 7H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 44.7, 45.5, 56.6, 68.4, 116.3, 127.2, 129.7, 129.8, 130.3, 132.4, 139.1, 159.7, 162.7, 176.5; Analiza elementarna: obliczona dla C₁₈H₂₂N₂O₅ + H₂O: C, 59.33; H, 6.64; N, 7.69; zbadana: C, 59.57; H, 6.51; N, 7.60.

Cbz-Gly-N(Pmb)-Leu-Gly-N(Me)OMe (20b): Produkt

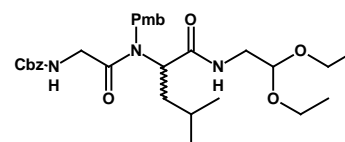
otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 3**. Wydajność 48%; 130 mg (0.24 mmol) bezbarwnego oleju; *R_f* = 0.27 (CHCl₃/MeOH,



95:5, v/v); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.86 (dd, *J*=6.3 Hz, *J*=11.7 Hz, 6H), 1.26 (s, 1H), 1.42-1.58 (m, 2H), 1.86 (t, *J*=7.4 Hz, 1H), 2.05 (d, *J*=3.3 Hz, 1H), 3.19 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.99-4.10 (m, 2H), 4.52 (s, 2H), 5.07 (t, *J*=7.0 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.81 (br s, 1H), 6.84 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 6.92 (br s, 1H), 7.11 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.27-7.39 (m, 5H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 22.4, 22.7, 25.1, 37.0, 40.1, 43.4, 47.5, 55.2, 56.4, 61.4, 66.8,

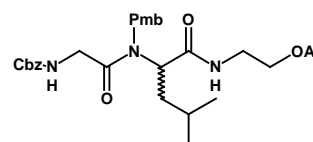
114.2, 127.4, 127.9, 128.0, 128.2, 128.4, 136.4, 156.1, 158.9, 169.4, 170.5, 170.6; IR (film w CHCl₃) ν_{\max} : 3329, 2958, 1722, 1655, 1513, 1442, 1249, 1177, 1030, 807, 754, 698 cm⁻¹; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla C₂₈H₃₈N₄O₇Na [M+Na]⁺: 565.2633; zbadano: 565.2643.

Cbz-Gly-N(Pmb)-Leu-Gly-CH(OEt)₂ (20c): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 3**. Produkt krystalizował podczas suszenia pod zmniejszonym ciśnieniem.



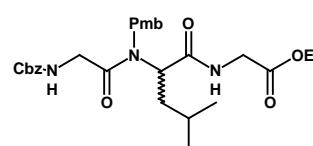
Produkt przekrystalizowano (aceton/woda). Wydajność 67%; 372 mg (0.67 mmol) białych kryształów; t.t. 92-93 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.85 (dd, $J=6.4$ Hz, $J=8.4$ Hz, 6H), 1.18 (dt, $J=2.7$ Hz, $J=6.8$ Hz, 6H), 1.40-1.56 (m, 2H), 1.78-1.93 (m, 1H), 3.18-3.30 (m, 1H), 3.30-3.40 (m, 1H), 3.42-3.55 (m, 2H), 3.57-3.71 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.96 (d, $J=4.4$ Hz, 2H), 4.44 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.96 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 5.74 (t, $J=4.3$ Hz, 1H), 6.54 (t, $J=5.2$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.20-7.40 (m, 5H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 15.2, 22.3, 22.7, 25.0, 37.1, 41.6, 43.3, 47.5, 55.2, 56.6, 62.5, 62.6, 66.8, 100.3, 114.2, 127.4, 127.9, 128.1, 128.4, 136.2, 156.1, 159.0, 170.4; IR (film w CHCl₃) ν_{\max} : 3328, 2957, 1723, 1648, 1514, 1455, 1249, 1176, 1128, 1058, 755, 698 cm⁻¹. Analiza elementarna obliczona dla C₃₀H₄₃N₃O₇: C, 64.61; H, 7.77; N, 7.53; zbadano: C, 64.55; H, 7.42; N, 7.58.

Cbz-Gly-N(Pmb)-Leu-Gly-CH₂OAc (20d): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 3**. Wydajność 89%; 471 mg (0.89 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.36$ (heksan/EtOAc, 4:6, v/v); ¹H



NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.85 (dd, $J=6.4$ Hz, $J=8.4$ Hz, 6H), 1.40-1.52 (m, 2H), 1.82-1.93 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 3.41 (q, $J=5.5$ Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.98 (dd, $J=4.8$ Hz, $J=12.0$ Hz, 2H), 4.02-4.10 (m, 1H), 4.10-4.18 (m, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.92 (t, $J=4.8$ Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.71 (br s, 1H), 6.70 (br s, 1H), 6.86 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.09 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.28-7.38 (m, 5H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 22.3, 22.6, 25.1, 36.9, 38.5, 43.3, 47.6, 55.2, 56.9, 62.8, 66.9, 114.3, 127.4, 128.0, 128.1, 128.5, 136.2, 156.2, 159.0, 170.4, 170.8, 171.1; IR (film w CHCl₃) ν_{\max} : 3329, 2957, 1726, 1650, 1514, 1455, 1368, 1249, 1177, 1051, 754, 698 cm⁻¹; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla C₂₈H₃₇N₃O₇Na [M+Na]⁺: 550.2524; zbadano: 550.2502.

Cbz-Gly-N(Pmb)-Leu-Gly-OEt (20e): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 3**. Wydajność 71%; 750 mg (1.42 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.46$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ¹H

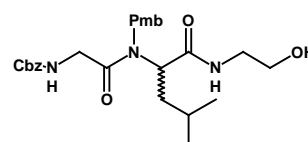


NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.78 (t, $J=5.7$ Hz, 6H), 1.19 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.28-1.58 (m, 2H),

1.60-1.94 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.83 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 3.93 (br s, 2H), 4.11 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.44 (s, 2H), 4.97 (m, 1H), 5.03 (s, 2H), 5.64 (br s, 1H), 6.78 (d, $J=7.8$ Hz, 3H), 7.04 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.10-7.40 (m, 4H); IR (film w CHCl_3) ν_{max} : 3330, 2958, 1724, 1649, 1514, 1465, 1418, 1249, 1200, 1178, 1030, 755, 698 cm^{-1} ; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7$: C, 63.74; H, 7.07; N, 7.96; zbadana: C, 63.62; H, 7.46; N, 7.57.

8.5.2. Synteza alkoholu 26

Metoda A: Hydroliza estru 20d: Do roztworu estru **20d** (196 mg, 0.38 mmol) w metanolu (2 ml) dodano wodny roztwór wodorotlenku sodu (375 μl , 1.50 mmol, 4 M). Reakcję prowadzono



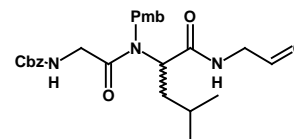
przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono octanem etylu (10 ml), przemyto wodnym roztworem kwasu solnego (10 ml, 1 M), fazę wodną ekstrahowano octanem etylu (10 ml), połączone fazy organiczne przemyto wodą (10 ml) i wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując produkt, który użyto w kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 96%, 177 mg (0.36 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.13$ (heksan:EtOAc = 4:6, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.86 (dd, $J=6.2$ Hz, $J=12.0$ Hz, 6H), 1.42-1.55 (m, 2H), 1.83-1.95 (m, 1H), 3.20-3.32 (m, 1H), 3.33-3.43 (m, 1H), 3.60-3.66 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.83 (dd, $J=5.2$ Hz, $J=16.8$ Hz, 1H), 3.99 (dd, $J=5.2$ Hz, $J=17.2$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J=17.2$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J=17.2$ Hz, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.96 (t, $J=7.0$ Hz, 1H), 5.09 (d, $J=2.4$ Hz, 2H), 5.75 (br s, 1H), 6.81 (br s, 1H), 6.87 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.11 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.28-7.38 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 22.4, 22.6, 25.1, 37.0, 42.4, 43.3, 47.9, 55.3, 56.9, 61.8, 67.1, 114.4, 127.5, 128.0, 128.1, 128.2, 128.5, 136.1, 156.8, 159.1, 171.1, 171.2; IR (film w CHCl_3) ν_{max} : 3329, 2957, 1726, 1650, 1514, 1455, 1368, 1249, 1177, 1051, 753, 698 cm^{-1} ; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 508.2418; zbadano: 508.2414.

Metoda B: Redukcja estru 20e: Do roztworu estru **20e** (150 mg, 0.28 mmol) w tetrahydrofuranie (5 ml) dodano chlorek wapnia (62 mg, 0.56 mmol), chlorek litu (24 mg, 0.56 mmol) i borowodorek sodu (53 mg, 1.4 mmol). Mieszaninę ogrzewano do temperatury 35 $^\circ\text{C}$ przez 20 godzin, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej i dodano metanol (5 ml). Osad odsączono, przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w dichlorometanie (5 ml), przemyto wodnym roztworem kwasu solnego (10 ml, 1 M), wysuszono (MgSO_4), rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 8:2 \rightarrow 5:5, v/v).

Wydajność 93%; 126 mg (0.26 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.23$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

8.5.3. Synteza aldehydu 27

Metoda A: Redukcja amidu Weinreba 20b. Do roztworu amidu Weinreba **20b** (54.2 mg, 0.1 mmol) w suchym tetrahydrofuranie (3 ml) w temperaturze $-50\text{ }^\circ\text{C}$ dodano wodorek litowo-glinowy (4.8



mg, 0.125 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze $-50\text{ }^\circ\text{C}$ przez 10 minut, a następnie w temperaturze $0\text{ }^\circ\text{C}$ przez 90 minut. Do mieszaniny dodano roztwór wodorosiarczanu potasu (0.15 ml, 0.15 mmol, 1 M), rozcieńczono wodą (10 ml) i dodano eter etylowy (10 ml). Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano eterem etylowym (10 ml), fazy organiczne połączono i przemyto kolejno roztworem kwasu solnego ($2 \times 15\text{ ml}$, 1 M), nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (15 ml) i solanką (15 ml) i wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej. Wydajność 39%, 19 mg (0.39 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.36$ (heksan/EtOAc, 4:6, v/v); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.70-0.95 (m, 6H), 1.42-1.54 (m, 2H), 1.82-1.94 (m, 1H), 3.70-3.82 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.94-4.15 (m, 2H), 4.52 (s, 2H), 5.09 (br s, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.73 (br s, 1H), 6.86 (d, $J=8.1\text{ Hz}$, 2H), 7.01 (br s, 1H), 7.11 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 2H), 7.24-7.39 (m, 5H), 9.56 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 22.4, 22.6, 25.1, 36.8, 43.4, 47.8, 50.0, 55.3, 56.6, 67.0, 114.3, 127.5, 128.0, 128.1, 128.5, 136.3, 156.3, 159.1, 170.9, 194.3; IR (film w CHCl_3) ν_{max} : 3330, 2958, 1710, 1653, 1514, 1456, 1420, 1350, 1249, 1177, 1031, 803, 754, 698 cm^{-1} ; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ [$\text{M}+\text{MeOH}+\text{Na}$] $^+$: 538.2524; zbadano: 538.2548.

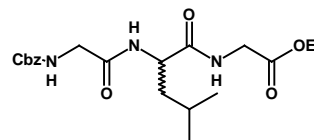
Metoda B: Hydroliza acetalu 20c: Do roztworu acetalu **20c** (114 mg, 0.204 mmol) w acetonie (2 ml) dodano wodę (1 ml) i kwas *p*-toluenosulfonowy (41 mg, 0.214 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 48 godzin oraz w temperaturze $50\text{ }^\circ\text{C}$ przez 1.5 godziny. Mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej, rozcieńczono octanem etylu (10 ml) i przemyto kolejno nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (15 ml), wodą (15 ml) i solanką (15 ml). Fazę organiczną wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 7:3, v/v). Wydajność 81%; 80 mg (0.165 mmol) bezbarwnego oleju; Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Metoda C: Utlenienie alkoholu **26**.

Procedura ogólna przygotowania roztworu podchlorynu sodu do reakcji utleniania katalizowanej 2,2,6,6-tetrametylopiperidyno-1-oksylem (TEMPO). Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed reakcją poprzez nasycenie wodorowęglanem sodu 12% wodnego roztworu podchlorynu sodu do otrzymania roztworu o stężeniu 5.5% i pH = 9.36.

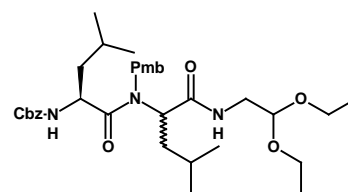
Do roztworu alkoholu **26** (63 mg, 0.13 mmol) w dichlorometanie (3 ml) dodano wodę (1 ml), 2,2,6,6-tetrametylopiperidynoksyd (TEMPO) (1.4 mg, 0.013 mmol) i bromek sodu (1.3 mg, 0.013 mmol). Do mieszaniny schłodzonej do temperatury 0 °C dodawano przez 30 minut 5.5% roztwór podchlorynu sodu w nasyconym roztworze wodorowęglanu sodu (0.5 ml). Po kolejnych 20 minutach mieszaninę rozcieńczono dichlorometanem (10 ml) i wodą (10 ml), fazy rozdzielono. Fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem, fazy organiczne połączono, przemyto wodnym roztworem kwasu solnego (10 ml, 1 M) zawierającego jodek potasu (166 mg, 1 mmol), wodnym roztworem tiosiarczanu sodu (10 ml, 10%), wodą i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 8:2, v/v). Wydajność 46%; 28 mg (0.06 mmol) bezbarwnego oleju; Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Synteza związku 31e: Usunięcie grupy Pmb z produktu reakcji Ugi'ego 20e: Do roztworu związku **20e** (51.1 mg, 0.097 mmol) w dioksanie (300 µl) dodano odczynnik Jones'a (220 µl, 0.5 mmol, 2.3 mmol). Mieszaninę wytrząsano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.



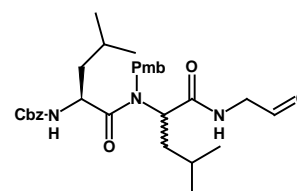
Mieszaninę rozcieńczono octanem etylu (5 ml) i przemyto wodą (2 × 5 ml). Fazę organiczną wysuszono (MgSO₄), rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Mieszaninę rozdzielono za pomocą chromatografii kolumnowej. Odzyskany substrat **20e**: wydajność 43%; 22.1 mg (0.042 mmol) bezbarwnego oleju. Produkt **31**: wydajność 18%; 7 mg (0.017 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.12$ (heksan/EtOAc, 4:6, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.60-0.98 (m, 6H), 1.19 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.30-1.70 (m, 2H), 1.72-2.00 (m, 1H), 3.82 (d, $J=5.2$ Hz, 2H), 3.90 (d, $J=5.2$ Hz, 2H), 4.11 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.36-4.56 (m, 1H), 5.05 (s, 2H), 5.54 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 6.60-6.90 (m, 2H), 7.10-7.38 (m, 5H).

Synteza związku 57: Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 3** jako mieszaninę diastereoizomerów. Wydajność 67%; 413 mg (0.67 mmol) bezbarwnego oleju; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.61 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 0.70 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 0.74-



1.00 (m, 10H), 1.20 (qu, $J=7.0$ Hz, 6H), 1.40-1.64 (m, 3H), 1.70-1.80 (m, 1H), 3.18-3.28 (m, 1H), 3.28-3.40 (m, 1H), 3.42-3.57 (m, 2H), 3.57-3.71 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 4.42 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.45 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.47-4.80 (m, 2H), 4.91 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 4.97 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.31-5.44 (m, 1H), 6.42 (br s, 1H), 6.69 (br s, 1H), 6.76 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.10-7.21 (m, 2H), 7.27-7.40 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.0, 21.2, 21.6, 22.1, 22.4, 22.5, 22.6, 23.1, 23.3, 23.4, 24.3, 24.6, 24.7, 25.0, 25.2, 36.9, 37.2, 41.6, 41.7, 41.9, 42.1, 48.1, 48.3, 50.2, 55.3, 55.2, 56.5, 56.7, 61.8, 62.1, 62.2, 62.5, 62.6, 66.8, 67.0, 100.3, 100.5, 113.5, 114.1, 114.2, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.5, 128.6, 128.9, 129.0, 129.1, 129.1, 135.8, 136.1, 136.3, 155.9, 156.2, 157.1, 158.4, 159.0, 159.1, 169.0, 170.4, 170.7, 173.5, 174.5, 174.7, 175.4; HRMS-ESI: (m/z) obliczone dla $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 636.3619; zbadano: 636.3650.

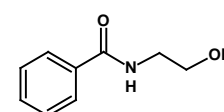
Synteza aldehydu 58. Do roztworu acetalu **57** (61.4 mg, 0.1 mmol) w acetonie (1 ml) dodano wodę (0.75 ml) i kwas *p*-toluenosulfonowy (20 mg, 0.105 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszało w temperaturze pokojowej przez 20 godzin, mieszaninę



rozcieńczono octanem etylu (10 ml) i przemyto kolejno nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (15 ml), wodą (15 ml) i solanką (15 ml). Fazę organiczną wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii olumnowej (heksan/ EtOAc , 8:2, v/v). Wydajność 83%; 43.3 mg (0.083 mmol) bezbarwnego oleju; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.70-1.00 (m, 12H), 1.40-1.68 (m, 4H), 1.70-1.90 (m, 1H), 1.92-2.40 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 4.40-4.54 (m, 2H), 4.55-4.70 (m, 2H), 4.74-4.90 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 5.10-5.18 (m, 1H), 6.86 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.97 (br s, 1H), 7.18 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.24-7.40 (m, 5H), 9.46 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.7, 21.2, 22.3, 22.5, 23.4, 24.3, 24.4, 24.6, 25.0, 25.3, 36.6, 37.3, 41.1, 41.7, 28.6, 28.9, 49.6, 50.3, 55.3, 56.3, 67.0, 114.2, 114.3, 127.3, 128.0, 128.5, 128.7, 129.1, 136.0, 136.1, 156.2, 156.6, 159.2, 171.1, 171.2, 173.7, 174.3, 176.0, 196.5, 197.2.

8.6. Optymalizacja modelowego utleniania *N*-(2-hydroksyetylo)benzamid (29) do *N*-(2-oksoetylo)benzamid (30)

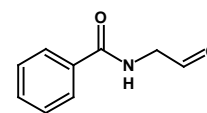
***N*-(2-hydroksyetylo)benzamid (29):** Do roztworu etanoloaminy (3.00 g, 49.1 mmol) w octanie etylu (50 ml) dodano chlorek benzoilu (7.51 g, 53.4 mmol) i roztwór wodorowęglanu sodu (10 g, 120 mmol) w wodzie (50 ml). Reakcję prowadzono przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Fazy rozdzielono, fazę



wodną ekstrahowano octanem etylu (2×30 ml). Fazy organiczne połączone, wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostały bezbarwny olej rozpuszczono w octanie etylu i dodano eter etylowy. Mieszaninę ochłodzono i wytrącone białe kryształy produktu odsączono. Przesącz zateżono, wytrącanie powtórzono. Kryształy produktu otrzymane w dwóch rzutach wytrącania połączone i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 71%; 5.77 g (35.0 mmol) białych kryształów; t.t. 60-62 °C (lit.¹⁹⁶ 52-56); $R_f = 0.27$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 3.63 (t, $J=4.7$ Hz, 2H, NHCH_2), 3.83 (t, $J=5.1$ Hz, 2H, CH_2O), 3.87 (s, 1H, OH), 7.20 (br s, 1H, NH), 7.35-7.70 (m, 3H, ArH), 7.81 (d, $J=7.4$ Hz, 2H, ArH); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 43.1, 62.2, 127.3, 128.8, 131.9, 134.3, 169.0; IR (film w CHCl_3) ν_{max} : 3307 (O-H), 1630 (C=O), 1535 (C-H).

***N*-(2-Oksoetylo)benzamid (30):**

Metoda A: Utlenianie katalizowane TEMPO



Do roztworu *N*-(2-hydroksyetylo)benzamidu (165.2 mg, 1.0 mmol) w dichlorometanie (5 ml) schłodzonego do 5 °C dodano roztwór bromku potasu (11.9 mg, 0.1 mmol) w wodzie (2 ml) i TEMPO (2.5 mg). Do intensywnie mieszanej mieszaniny przez 7 minut dodawano 5.5% roztwór podchlorynu sodu w nasyconym roztworze wodorowęglanu sodu (1.62 ml, 1.2 mmol). Po 15 minutach mieszaninę rozcieńczono wodą (5 ml) i dichlorometanem (10 ml). Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (5×10 ml). Połączone fazy organiczne wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując produkt. Wydajność 67%; 110 mg (0.67 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.32$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 4.20-4.35 (m, 2H, NHCH_2), 7.12 (br s, 1H, NH), 7.30-7.70 (m, 3H, ArH), 7.80 (d, $J=7.4$ Hz, 2H, ArH), 9.52 (s, 1H, CHO); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 65.7, 127.5, 128.9, 131.2, 134.0, 169.2, 194.6; IR (film w CHCl_3) ν_{max} : 3322 (N-H), 1725 (HC=O), 1642 (NC=O), 1540 (C-H).

Metoda B. Utlenianie metodą Swerna

Do roztworu chlorku oksalilu (93 μl , 1.1 mmol) w dichlorometanie (10 ml) schłodzonego do temperatury -60 °C dodano roztwór DMSO (89 μl , 1.25 mmol) w dichlorometanie (1 ml). Po 5 minutach dodano roztwór *N*-(2-hydroksyetylo)benzamidu (165.2 mg, 1.0 mmol) w dichlorometanie (2 ml). Po 15 minutach dodano trietyloaminę (0.7 ml, 5.0 mmol) i pozostawiono do ogrzania do temperatury pokojowej. Mieszaninę mieszano przez kolejne 16 godzin. Mieszaninę przemyto nasyconym roztworem chlorku amonu (10 ml), fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (2×10 ml), połączone fazy organiczne przemyto 10%

roztworem kwasu cytrynowego (2×10 ml), wodą (10 ml) i solanką (10 ml) i wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując produkt jao pozostałość. Wydajność 31%, 51 mg (0.31 mmol) bezbarwnego oleju; Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A; IR (film) ν_{max} : 3330 (N-H), 1725 (HC=O), 1642 (NC=O), 1534 (C-H).

Metoda C. Utlenianie reagentem Dess-Martina

Do zawiesiny reagenta Dess-Martin'a (127.2 mg, 0.3 mmol) w dichlorometanie (2 ml) dodano *N*-(2-hydroksyetylo)benzamid (33 mg, 0.2 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1.5 godziny. Mieszaninę przesączono przez krótką kolumnę z zasadowego tlenku glinu (2.5 g, DCM). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 8:2→7:3, v/v). Wydajność 85%; 27.6 mg (0.17 mmol) bezbarwnego oleju; Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A; IR (film w CHCl_3) ν_{max} : 3330 (N-H), 1724 (HC=O), 1645 (NC=O), 1540 (C-H).

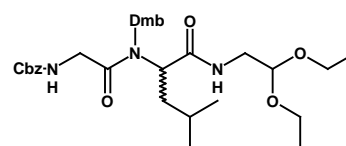
Metoda D. Utlenianie chlorochromianem pirydyny

Do zawiesiny neutralnego tlenku glinu (1.5 g) i chlorochromianu pirydyny (323 mg, 1.5 mmol) w dichlorometanie (10 ml) dodano *N*-(2-hydroksyetylo)benzamid (165 mg, 1.0 mmol) w dichlorometanie (2 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Mieszaninę przesączono przez celit, przesącz zatężono otrzymując 160 mg surowego produktu w postaci ciemnobrunatnego oleju. Analiza chromatografii cienkowarstwowej wykazała obecność produktu ($R_f = 0.31$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v) i znacznej ilości zanieczyszczeń ($R_f = 0.20$; 0.39; 0.63; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v). Oczyszczanie produktu z zastosowaniem chromatografii kolumnowej nie było efektywne; Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A; IR (film w CHCl_3) ν_{max} : 3320 (N-H), 1713 (HC=O), 1640 (NC=O), 1532 (C-H).

8.7. Modelowa synteza aldehydu 35 z zastosowaniem reakcji Ugiego z izocyjankami 5c-5e

8.7.1. Reakcje Ugiego z izocyjankami 5c-5e

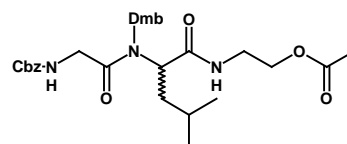
Synteza związku 33c: Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 3**. Produkt po wydzieleniu z zastosowaniem chromatografii kolumnowej na żelu rzemionkowym zawierał zanieczyszczenia. Po odparowaniu eluentu pozostałość rozpuszczono w układzie



heksan/EtOAc, 5:5, v/v (20 ml) i przesączono przez warstwę tlenku glinu (5 g) otrzymując produkt w postaci czystej. Wydajność 57%; 332 mg (0.57 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.44$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.87 (dd, $J=1.3$ Hz, $J=6.4$ Hz, 6H), 1.18 (dt, $J=4.3$, $J=7.1$ Hz, 6H), 1.46-1.64 (m, 2H), 1.93 (qu, $J=7.0$ Hz, 1H), 3.12-3.26 (m, 2H), 3.44-3.54 (m, 2H), 3.65 (dq, $J=7.0$ Hz, $J=9.4$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.13-4.20 (m, 2H), 4.32-4.48 (m, 3H), 4.57 (t, $J=7.0$ Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.74 (br s, 1H), 6.39-6.46 (m, 3H), 7.00 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.28-7.38 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 15.2, 15.3, 22.5, 22.6, 25.2, 36.8, 41.9, 43.2, 45.0, 55.4, 57.2, 62.9, 62.9, 66.8, 98.7, 100.8, 104.0, 115.7, 128.0, 128.1, 128.5, 129.3, 136.4, 156.1, 157.1, 160.9, 169.7, 170.5; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 610.3099; zbadano: 610.3070.

Synteza związku 33d: Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą**

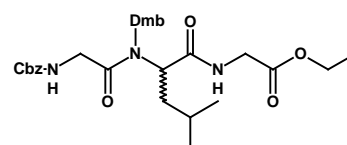
ogólną 3. Wydajność 83%; 926 mg (1.66 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.38$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz,



CDCl_3) δ 0.86 (t, $J=6.5$ Hz, 6H), 1.50 (qu, $J=6.5$ Hz, 1H), 1.51-1.63 (m, 1H), 1.86-1.96 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 3.35 (q, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.05 (t, $J=5.4$ Hz, 2H), 4.12 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.41 (s, 2H), 4.64 (br s, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.70 (br s, 1H), 6.45 (s, 2H), 6.63 (br s, 1H), 6.99 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.29-7.38 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 20.8, 22.5, 22.6, 25.1, 36.7, 38.4, 43.1, 44.7, 55.2, 55.4, 57.5, 62.9, 66.8, 98.6, 104.0, 115.8, 128.0, 128.1, 128.4, 128.9, 136.4, 156.2, 158.0, 160.8, 170.3, 170.6, 171.0; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 580.2629; zbadano: 580.2606.

Synteza związku 33e: Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą**

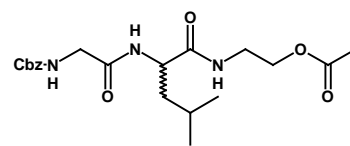
ogólną 3. Wydajność 57%, 301 mg (0.57 mmol) żółtego oleju; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.85 (d, $J=6.2$ Hz, 6H), 1.25 (t,



$J=7.2$ Hz, 3H), 1.46-1.60 (m, 2H), 1.85-1.97 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.84 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 3.98 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 4.17 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.42 (s, 2H), 4.74 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 5.80 (br s, 1H), 6.43 (s, 2H), 6.85 (t, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.27-7.38 (m, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 14.0, 22.5, 25.0, 36.7, 41.2, 43.1, 36.7, 41.2, 43.1, 44.7, 55.2, 55.3, 57.1, 61.3, 66.8, 67.0, 98.6, 103.9, 115.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.4, 128.4, 128.9, 136.4, 156.2, 158.0, 160.8, 169.5, 170.4, 170.8; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 580.2629; zbadano: 580.2602.

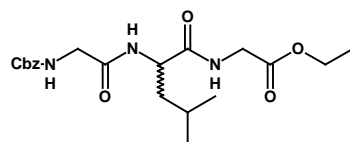
8.7.2. Reakcje usuwania grupy Dmb i synteza aldehydu 35

Synteza związku 31d: Do roztworu estru **33d** (569 mg, 1.02 mmol) w dichlorometanie (5 ml) dodano kwas trifluoroctowy (2 ml). Mieszaninę reakcyjną podgrzano do temperatury 50 °C i



mieszano przez 1 godzinę. Mieszanina zmieniła barwę na malinową. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono w łaźni z wodą i lodem, rozcieńczono dichlorometanem (5 ml) i zobojętniano wodnym nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu do momentu odbarwienia roztworu. Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (2 × 15 ml), fazy organiczne połączono i przemyto kolejno; wodą (20 ml), solanką (20 ml), a następnie wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 5:5, v/v). Wydajność 88%; 367 mg (0.90 mmol) bezbarwnego oleju; *R_f* = 0.29 (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (t, *J*=6.8 Hz, 6H), 1.45-1.55 (m, 1H), 1.55-1.72 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 3.40-3.55 (m, 2H), 3.84-3.92 (m, 2H), 4.06-4.20 (m, 2H), 4.43 (dt, *J*=6.1 Hz, *J*=8.5 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.77 (br s, 1H), 6.89 (br s, 1H), 6.91 (br s, 1H), 7.30-7.37 (m, 5H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.2, 20.6, 20.8, 22.0, 22.7, 24.7, 38.7, 40.1, 44.5, 51.6, 60.4, 62.7, 67.2, 128.1, 128.3, 128.5, 136.1, 156.7, 169.3, 171.2, 172.0; HRMS-ESI: (*m/z*) obliczono dla C₂₀H₂₉N₃O₆Na [M+Na]⁺: 430.1949; zbadano: 430.1959.

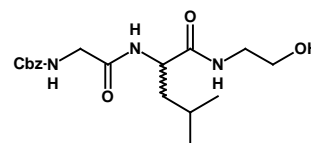
Synteza związku 31e: Ester **33e** (214 mg, 0.38 mmol) rozpuszczono w kwasie trifluoroctowym (1 ml, 13.4 mmol) i



mieszano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Mieszanina zmieniła barwę na malinową. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono dichlorometanem (10 ml) i zobojętniano nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu do momentu odbarwienia roztworu. Fazy rozdzielono, fazę wodną przemyto dichlorometanem (10 ml). Fazy organiczne połączono, przemyto wodą (10 ml), solanką (10 ml), wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 8:2, v/v). Wydajność 76%; 117 mg (0.29 mmol) bezbarwnego oleju; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (dd, *J*=5.9 Hz, *J*=9.9 Hz, 6H), 1.24 (t, *J*=7.2 Hz, 3H), 1.47-1.57 (m, 1H), 1.57-1.72 (m, 2H), 3.90 (d, *J*=4.6 Hz, 2H), 3.92-3.97 (m, 2H), 4.15 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 4.57-4.66 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 6.00 (t, *J*=5.0 Hz, 1H), 7.26-7.36 (m, 6H), 7.41 (t, *J*=5.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.0, 20.6, 21.9, 22.7, 24.6, 41.0, 44.3, 51.5, 61.4, 67.0, 127.9, 128.1, 127.4, 136.2, 156.7, 169.6, 169.7, 172.3; HRMS-ESI: (*m/z*) obliczono dla C₂₀H₂₉N₃O₆Na [M+Na]⁺: 430.1949; zbadano: 430.1927.

Synteza alkoholu 34:

Metoda A: Hydroliza estru 31d: Do roztworu estru **31d** (367 mg, 0.90 mmol) w metanolu (5 ml) dodano wodny roztwór wodorotlenku sodu (0.56 ml, 2.25 mmol, 4 M). Mieszaninę

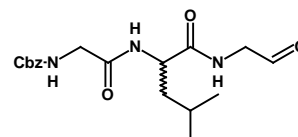


reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 45 minut. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w wodnym roztworze kwasu solnego (10 ml, 1 M) i ekstrahowano octanem etylu (3 × 10 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (CHCl₃/MeOH, 97.5:2.5, v/v). Wydajność 85%; 278 mg (0.76 mmol) bezbarwnego oleju. R_f = 0.23 (CHCl₃/MeOH, 98:2, v/v); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (dd, J=5.9 Hz, J=9.6 Hz, 6H), 1.48-1.70 (m, 3H), 3.16-3.28 (m, 2H), 3.38-3.50 (m, 2H), 3.54-3.68 (m, 2H), 3.85 (dq, J=5.3 Hz, J=17.5 Hz, 2H), 4.46-4.5 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 6.11 (br s, 1H), 7.28-7.37 (m, 5H), 7.40 (t, J=5.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.9, 22.8, 41.0, 42.2, 44.3 52.0, 61.3, 67.2, 128.0, 128.3, 128.5, 136.0, 157.0, 169.9, 173.0; IR (film w CHCl₃) ν_{max}: 3299, 3069, 2957, 1709, 1651, 1541, 1455, 1255, 1155, 1052, 754, 697 cm⁻¹; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla C₁₈H₂₇N₃O₅Na [M+Na]⁺: 388.1843; zbadano: 388.1825.

Metoda B: Redukcja estru 31e: Do roztworu estru **31e** (41 mg, 0.10 mmol) w tetrahydrofuranie (5 ml) dodano chlorek wapnia (22 mg, 0.20 mmol), chlorek litu (8.4 mg, 0.20 mmol) i borowodorek sodu (19 mg, 0.50 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 50 °C przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej i dodano metanol (2 ml). Osad odsączono, przesącz zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w dichlorometanie (10 ml), przemyto wodnym roztworem kwasu solnego (10 ml, 1 M). Fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (5 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (CHCl₃/MeOH, 98:2, v/v). Wydajność 50%; 17 mg (0.05 mmol) bezbarwnego oleju; R_f = 0.22 (CHCl₃/MeOH, 98:2, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Synteza aldehydu 35:

Metoda A: Utlenienie alkoholu 34: Do zawiesiny reagenta Dess-Martina (63.6 mg, 0.15 mmol) w dichlorometanie (1 ml) dodano

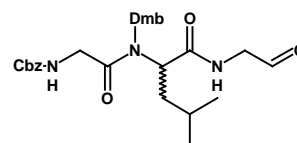


roztwór alkoholu **34** (36.5 mg, 0.10 mmol) w dichlorometanie (1 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Mieszaninę przesączono przez kolumnę z zasadowym tlenkiem glinu (2.1 g) wymywając produkt układem CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v. Wydajność 93%; 33.8 mg (0.093 mmol) bezbarwnego oleju, R_f=0.27 (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (d, J=4.4 Hz, 6H), 1.40-1.75 (m, 2H), 1.90-2.15 (m, 1H), 3.34-3.47 (m, 1H), 3.70-3.90 (m, 2H), 4.00-4.10 (m, 1H), 4.40-4.65 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.83 (br s, 1H), 7.02 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.20-7.40 (m, 5H), 9.52 (s, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 22.3, 23.2, 25.1, 41.3, 44.9 50.3, 51.9, 67.6, 128.4, 128.6, 128.9, 136.4, 169.9, 169.9, 172.9, 197.0; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla C₁₈H₂₅N₃O₅Na [M+Na]⁺: 386.1687; zbadano: 386.1697.

Metoda B: Usunięcie grupy Dmb i hydroliza grupy acetalowej w związku 33c: Związek **33c** (90 mg, 0.204 mmol) rozpuszczono w układzie kwas trifluorooctowy/woda (1 ml, 19:1). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Mieszanina zmieniła barwę na malinową. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono dichlorometanem (5 ml) i zobojętniano nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu do momentu odbarwienia. Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (3 × 10 ml). Fazy organiczne połączono, przemyto wodą (10 ml), solanką (10 ml) i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej. Wydajność 18%; 13 mg (0.035 mmol) bezbarwnego oleju; R_f = 0.36 (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Synteza aldehydu 36.

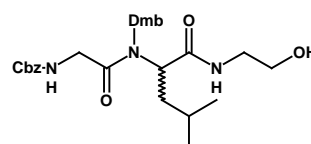
Metoda A: Hydroliza grupy acetalowej w związku 33c: Do roztworu acetalu **33c** (182 mg, 0.31 mmol) w acetonie (3 ml) dodano wodę (1 ml) i kwas *p*-toluenosulfonowy (59 mg, 0.31 mmol).



Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 55 °C przez 2.5 godziny. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej, rozcieńczono octanem etylu (10 ml) i przemyto kolejno nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (15 ml), wodą (15 ml) i solanką (15 ml). Fazę organiczną wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 7:3, v/v). Wydajność 82%; 130 mg (0.25 mmol) bezbarwnego oleju; R_f = 0.28 (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.88 (d, J=6.5 Hz, 6H), 1.47-1.59 (m, 1H), 1.59-1.69 (m, 1H), 1.89-1.99 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.93 (dd,

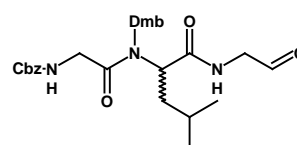
$J=3.8$ Hz, $J=5.0$ Hz, 2H), 4.22 (dq, $J=4.5$, $J=16.8$ Hz, 2H), 4.41 (q, $J=17.2$ Hz, 2H), 4.65 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.75 (br s, 1H), 6.44 (s, 2H), 6.91 (br s, 1H), 7.02 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.27-7.39 (m, 5H), 9.49 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.5, 22.4, 22.7, 25.1, 36.7, 43.2, 45.2, 50.1, 55.4, 55.4, 57.1, 66.9, 98.7, 104.0, 115.5, 128.0, 128.1, 128.5, 129.6, 136.4, 156.3, 158.2, 161.0, 170.3, 171.1, 175.2, 196.6; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 536.2367; zbadano: 536.2381.

Metoda B: Hydroliza grupy estrowej w związku 33d: Do roztworu estru **33d** (406 mg, 0.73 mmol) w metanolu (8 ml) dodano roztwór wodorotlenku sodu (0.460 ml, 1.83 mmol, 4 M).



Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Mieszaninę zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w kwasie solnym (5 ml, 1 M) i ekstrahowano octanem etylu (3×10 ml). Fazy organiczne połączono, wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując produkt, który użyto do kolejnej reakcji bez salszego oczyszczania. Wydajność 98%; 368 mg (0.71 mmol) bezbarwnego oleju. $R_f = 0.26$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 538.2524; zbadano: 538.2520.

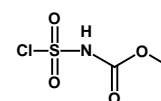
Utlenienie grupy alkoholowej: Do roztworu otrzymanego w poprzedniej reakcji alkoholu (34 mg, 0.066 mmol) w dichlorometanie (2 ml) dodano reagent Dess-Martina (42.4 mg, 0.10



mmol). Po 30 minutach do mieszaniny reakcyjnej dodano roztwór NaOH (5 ml, 5%) i mieszano przez kolejne 5 minut. Mieszaninę rozcieńczono dichlorometanem (5 ml), fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (4×10 ml). Fazy organiczne połączono, wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 99:1, v/v). Wydajność 92%; 31 mg (0.060 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.36$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

8.8. Synteza reagenta Burgessa

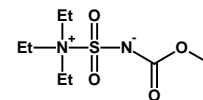
N-Chlorosulfonylokarbaminian metylu (47): Do roztworu izocyjanianu chlorosulfonylowego (2 g, 14.1 mmol) w bezwodnym benzenie (2 ml) w



temperaturze 0°C , w atmosferze azotu wkraplano przez 5 minut mieszaninę bezwodnego metanolu (0.6 ml, 14.8 mmol) i benzenu (2 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 0°C przez 30 minut. Składniki lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem

otrzymując olej. Dodano heksan i ochłodzono do wytrącenia kryształów produktu, które odsączono. Wydajność 93%; 2.2691 g (13.1 mmol); t.t. 69-74 °C (lit.¹⁶⁶ 70-71).

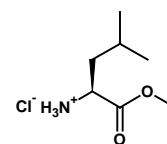
Reagent Burgessa (48): Do roztworu trietyloaminy (3.1 ml, 22.5 mmol) w bezwodnym benzenie (10 ml) w atmosferze azotu wkraplano przez 30 minut roztwór *N*-chlorosulfonylokarbaminianu metylu (1.75 g, 10.1 mmol) w bezwodnym benzenie (25 ml). Po 20 minutach odsączono przez celit wytrącony osad chlorowodoru trietyloaminy. Z przesączu pod zmniejszonym ciśnieniem odparowano rozpuszczalnik. Pozostały olej krystalizował po ochłodzeniu. Kryształy ługowano heksanem i odsączono. Wydajność 92%; 2.22 g (9.3 mmol) białych kryształów; t.t. 71-73 °C (lit.¹⁶⁶ 71-72).



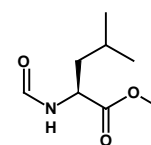
8.9. Synteza chiralnych izocyjanków z leucyny

8.9.1. Synteza izocyjanku (*S*)-41

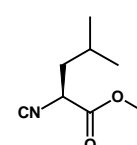
Chlorowodorek *O*-metylo-L-leucyny: Chlorowodorek (2*S*)-2-amino-4-metylopentanianu metylu ((*S*)-39): Do zawiesiny L-leucyny (5 g, 38.1 mmol) w metanolu (50 ml, 1.23 mol) ochłodzonej do 0°C wkraplano chlorek tionylu (5.6 ml, 76.2 mmol) przez 10 minut. Osad rozpuścił się. Mieszaninę reakcyjną podgrzano do temperatury 50°C i mieszano przez 3 godziny. Mieszaninę ochłodzono, a rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano eter etylowy. Z mieszaniny wytrącił się produkt w postaci białych kryształów. Wydajność 90%; 6.2 g (34.2 mmol) białych kryształów; t.t. 150-151 °C (lit.¹⁹⁷ 150-151).



***N*-Formylo-*O*-metylo-L-leucyna: (2*S*)-2-(formyloamino)-4-metylopentanian metylu ((*S*)-40):** Mieszaninę związku (*S*)-39 (2 g, 11 mmol) i ortomrówczanu etylu (15 ml, 90 mmol) ogrzewano do temperatury 95°C przez 4 godziny. Nadmiar ortomrówczanu etylu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 71%; 1.35 g (7.8 mmol) bezbarwnego oleju; t. wrz. 150 °C (2.0 mmHg) (lit.¹⁶⁵ 132 (1.0)); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.95 (dd, *J*=5.8 Hz, *J*=2.0 Hz, 6H), 1.50-1.76 (m, 3H), 3.75 (s, 3H), 4.65-4.82 (m, 1H), 6.25-6.55 (bd, 1H), 8.22 (s, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 22.1, 23.0, 25.1, 41.8, 49.6, 52.7, 161.1, 173.4. [α]_D²² = -42.5 (c 1.0, MeOH) (lit.¹⁶⁵ -43.2 (c 1.0, MeOH)).



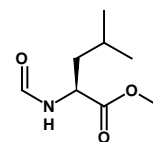
(2*S*)-2-Izocyjano-4-metylopentanian metylu ((*S*)-41): Do roztworu związku (*S*)-40 (1 g, 5.8 mmol) i *N*-metylmorfoliny (2.75 ml, 25 mmol) w dichlorometanie (10 ml) w temperaturze -40 °C, w atmosferze azotu, dodawano przez 1 godzinę roztwór difosgeny (422 μl, 3.5 mmol) w dichlorometanie (5 ml). Mieszanie



kontynuowano przez kolejną godzinę w $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (15 ml), fazy rozdzielono, fazę organiczną przemyto wodnym roztworem wodorowęglanu sodu (15 ml, 7.5%) i wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/ EtOAc , 97:3, v/v). Wydajność 57%; 516.8 mg (3.33 mmol) lekko żółtego oleju; $R_f = 0.75$ (CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 0.98 (dd, $J=6.4\text{ Hz}$, $J=4.6\text{ Hz}$, 6H), 1.65-2.0 (m, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.29 (dd, $J=9.7\text{ Hz}$, $J=4.7\text{ Hz}$, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 21.2, 22.9, 25.1, 41.6, 53.6, 55.4, 167.9. IR (film) ν_{max} : 2961 (CH_3), 2148 ($-\text{N}\equiv\text{C}$), 1760 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} ; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2$: C, 61.91; H, 8.44; N, 9.02; zbadana: C, 61.72; H, 8.52; N, 8.90; $[\alpha]_D^{25} = -4.38$ (c 2.0, CHCl_3).

***N*-formylo-*O*-metylo-*L*-leucyna: (2*S*)-2-(formyloamino)-4-metylopentanian metylu ((*S*)-**

40): (hydroliza izocyjanku (*S*)-41): Roztwór izocyjanku (*S*)-41 (50 mg, 0.36 mmol) w eterze etylowym (5 ml) schłodzono do temperatury $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dodano stężony kwas solny (350 μl). Po 20 minutach dodano nasycony roztwór

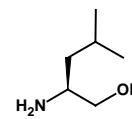


wodorowęglanu sodu do osiągnięcia $\text{pH} > 8$. Mieszaninę ekstrahowano eterem etylowym (15 ml). Fazę organiczną przemyto wodą i wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując oleisty produkt. Wydajność 67%; 42 mg (0.24 mmol) bezbarwnego oleju; $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 0.89 (d, $J=4.0\text{ Hz}$, 6H), 1.42-1.72 (m, 3H), 3.68 (s, 3H), 4.54-4.82 (m, 1H), 6.20-6.60 (m, 1H), 8.14 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 22.1, 23.0, 25.1, 41.8, 49.6, 52.7, 161.2, 173.4; $[\alpha]_D^{22} = -10.5$ (c 1.0, MeOH) (lit.¹⁶⁵ -43.2 (c 1.0, MeOH)).

8.9.2. Synteza izocyjanków (*S*)-45 i (*R*)-45

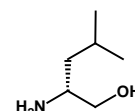
L-Leucynol: (2*S*)-2-amino-4-metylopentan-1-ol ((*S*)-42): Procedura ogólna 4:

Do zawiesiny borowodoru sodu (5.77 g, 152.4 mmol) w bezwodnym tetrahydrofuranie (100 ml) dodano L-leucynę (10.0 g, 76.2 mmol) w atmosferze azotu. Mieszaninę ochłodzono do $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ i przez 1 godzinę wkraplało roztwór jodu (19.3 g, 76.2 mmol) w bezwodnym tetrahydrofuranie (50 ml). Mieszano do momentu, w którym przestały wydzielać się pęcherzyki gazu (około 30 minut), następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano do temperatury wrzenia przez 16 godzin, ochłodzono do $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ i porcjami dodawano metanol do momentu rozpuszczenia osadu. Po 30 minutach składniki lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w wodnym roztworze wodorotlenku potasu (100 ml, 20%) i mieszano przez 3 godziny. Ekstrahowano dichlorometanem ($4 \times 75\text{ ml}$). Fazy organiczne zebrano, wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod



zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 73%; 6.49 g (55.3 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.42$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 10:2:0.25, v/v/v); t. wrz. 57 °C (1.0 mmHg); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.89 (t, $J=6.4$ Hz, 6H), 1.17 (t, $J=7.0$ Hz, 2H), 1.68 (nonet, $J=6.8$ Hz, 1 H), 2.10 (br s, 3H), 2.82-2.96 (m, 1H), 3.21 (dd, $J=10.6$ Hz, $J=7.8$ Hz, 1H), 3.55 (dd, $J=10.6$ Hz, $J=3.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 22.5, 23.7, 25.0, 44.0, 50.9, 67.4; $[\alpha]_D^{23} = +4.1$ (c 4.00, EtOH) (lit.¹⁹⁸ = +4.2 (c 9.0, EtOH)).

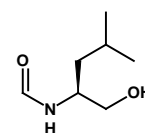
D-Leucynol: (2R)-2-amino-4-metylopentan-1-ol ((R)-42): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 4**. Wydajność 44%; 3.93 g (33.5 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.41$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 10:2:0.25, v/v/v); t. wrz.



55 °C (1.0 mmHg); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (S)-42; $[\alpha]_D^{23} = -4.1$ (c 4.00, EtOH) (lit. (enancjomer)¹⁹⁸ +4.2 (c 9.0, EtOH));

N-Formylo-L-leucynol: (1S)-1-hydroksymetylo-3-metylobutyloformamid ((S)-43):

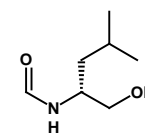
Procedura ogólna 5: Mieszaninę L-leucynolu (6.3 g, 53.8 mmol) i mrówczanu etylu (60 ml, 0.74 mol) ogrzewano do temperatury wrzenia przez 3 godziny. Mieszaninę ochłodzono, składniki lotne odparowano pod zmniejszonym



ciśnieniem otrzymując produkt, który został użyty do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 100%; 7.68 g (53.7 mmol) lekko żółtego oleju; t. wrz. 132-136 °C (0.3 mmHg); $R_f = 0.69$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 10:2:0.25, v/v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.93 (d, $J=6.6$ Hz, 6H), 1.20-1.48 (m, 2H), 1.50-1.66 (m, 1 H), 3.40-3.78 (m, 3H), 4.12 (br s, 1H), 6.11 (br s, 1H), 8.18 (s, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 22.4, 23.4, 25.2, 40.4, 49.2, 65.8, 162.3; IR (film) ν_{max} : 3280 (O-H), 2958 (CH_3), 1660 (C=O), cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{23} = -32.5$ (c 4.00, CHCl_3).

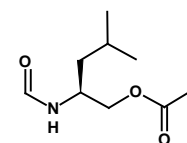
N-Formylo-D-leucynol: (1R)-1-hydroksymetylo-3-metylobutyloformamid ((R)-43):

Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 5**. Wydajność 95%; 4.55 g (31.3 mmol) lekko żółtego oleju; $R_f = 0.69$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 10:2:0.25, v/v/v); $[\alpha]_D^{23} = +31.8$ (c 4.00, CHCl_3); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (S)-43.



O-Acylo-N-formylo-L-leucynol: octan (2S)-2-(formyloamino)-4-metylopentylu ((S)-44):

Procedura ogólna 6: Do roztworu N-formylo-L-leucynolu (7.66 g, 52.8 mmol) w dichlorometanie (100 ml) w atmosferze azotu dodano pirydynę (8.5 ml, 105.6 mmol), bezwodnik kwasu octowego (15.0 ml, 158.4 mmol) oraz

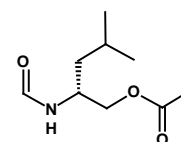


katalityczną ilość *N,N*-dimetyloaminopirydyny (20 mg). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Mieszaninę reakcyjną przemyto wodnym roztworem siarczanu miedzi (3 × 25 ml, 10%), nasyconym wodnym roztworem wodorowęglanu sodu (2 × 25 ml) oraz wodą (2 × 25 ml). Fazę organiczną wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt krystalizowano z eteru etylowego. Wydajność 73%; 7.25 g (38.8 mmol) białych kryształów; t.t. 45-48 °C; R_f = 0.50 (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.80-1.00 (m, 6H), 1.28-1.48 (m, 2H), 1.50-1.75 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 3.90-4.20 (m, 2H), 4.30-4.50 (m, 1H), 5.72 (br s, 1H), 8.19 (s, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 22.3, 23.2, 24.6, 25.0, 40.8, 45.7, 50.1, 66.5, 161.1, 171.4; IR (film) ν_{max}: 2960 (CH₃), 1740 (NC=O), 1660 (OC=O), 1242 (CH₂-O) cm⁻¹; [α]_D²⁵ = -47.3 (c 1.5, CHCl₃).

***O*-Acylo-*N*-formylo-*D*-leucynol: octan (2*R*)-2-(formyloamino)-4-metylopentylu ((*R*)-44):**

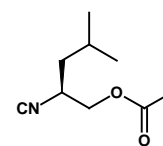
Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 5**. Wydajność 74%; 4.30 g (22.9 mmol) białych kryształów; t.t. 40-43 °C; [α]_D²⁵ = +46.5 (c 1.5, CHCl₃);

Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (*S*)-44.



Octan (2*S*)-2-izocyjano-4-metylopentylu ((*S*)-45)

Metoda A: Do ochłodzonego do temperatury -40 °C roztworu *O*-acylo-*N*-formylo-*L*-leucynolu (223.9 mg, 1.2 mmol) i *N*-metylomorfoliny (660 μl, 6.0 mmol) w dichlorometanie (5 ml) w atmosferze azotu wkraplano przez 1 godzinę roztwór difosgeny (145 μl, 1.2 mmol) w dichlorometanie (3 ml). Następnie mieszano przez kolejną godzinę w temperaturze -40 °C. Dodano wodę (10 ml), fazy rozdzielono, fazę organiczną przemyto wodnym roztworem wodorowęglanu sodu (10 ml, 7.5%) i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 98:2, v/v). Wydajność 31%; 62 mg (0.37 mmol) bezbarwnego oleju; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (dd, *J*=8.8 Hz, *J*=6.6 Hz, 6H), 1.14-1.34 (m, 1H), 1.50-1.71 (m, 1H), 1.71-1.91 (s, 1H), 2.06 (s, 3H), 3.70-3.88 (m, 1H), 3.94-4.20 (m, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 20.9, 21.4, 23.2, 24.9, 40.3, 52.3, 65.6, 170.7; IR (film) ν_{max}: 2962 (CH₃), 2143 (-N≡C), 1747 (C=O), 1237 (CH₂-O) cm⁻¹; [α]_D²³ = +1.30 (c 1.0, CHCl₃).



Metoda B: Do roztworu *O*-acylo-*N*-formylo-*L*-leucynolu (187 mg, 1.0 mmol) w bezwodnym dichlorometanie (5 ml) dodano odczynnik Burgessa (357 mg, 1.5 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 3.5 godziny oraz w temperaturze wrzenia przez 30 minut. Mieszaninę rozcieńczono dichlorometanem (10 ml) i przemyto wodą

(3 × 10 ml). Fazę organiczną wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 98:2, v/v). Wydajność 54%; 91.7 mg (0.54 mmol) bezbarwnego oleju; IR (film) ν_{\max} : 2962 (CH₃), 2142 (–N≡C), 1747 (C=O), 1238 (CH₂–O) cm⁻¹; $[\alpha]_D^{23} = +5.08$ (*c* 1.0, CHCl₃); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

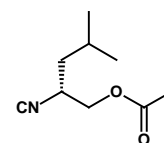
Metoda C: Do roztworu *O*-acylo-*N*-formylo-L-leucynolu (215 mg, 1.15 mmol) i trietyloaminy (800 μl, 5.75 mmol) w bezwodnym tetrahydrofuranie (10 ml), w atmosferze azotu wkraplano roztwór tlenochlorku fosforu (129 μl, 1.38 mmol) w bezwodnym tetrahydrofuranie (5 ml) nie dopuszczając do wzrostu temperatury powyżej 5 °C. Po 3 godzinach mieszaninę wylano na wodę z lodem i ekstrahowano eterem etylowym (3 × 15 ml). Fazy rozdzielono, fazę organiczną wysuszono (MgSO₄). Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 98:2, v/v). Wydajność 86%; 168.2 mg (0.99 mmol) lekko żółtego oleju; IR (film) ν_{\max} : 2962 (CH₃), 2142 (–N≡C), 1750 (C=O), 1235 (CH₂–O) cm⁻¹; $[\alpha]_D^{23} = +5.05$ (*c* 1.0, CHCl₃); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Metoda D: Do roztworu *O*-acylo-*N*-formylo-L-leucynolu (187 mg, 1.0 mmol) w bezwodnym dimetyloformamidzie (5 ml) w atmosferze azotu wkraplano roztwór chlorku tionylu (80 μl, 1.1 mmol) w bezwodnym dimetyloformamidzie (2 ml) nie dopuszczając do wzrostu temperatury powyżej –50 °C. Temperaturę mieszaniny podniesiono do –30 °C, schłodzono do –50 °C i dodano bezwodny węgiel sodu (122 mg, 1.15 mmol). Do mieszaniny dodano schłodzoną do temperatury 0 °C wodę (10 ml) i ekstrahowano octanem etylu (2 × 10 ml). Fazę organiczną wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 98:2, v/v). Wydajność 71%; 121 mg (0.71 mmol) lekko żółtego oleju; IR (film) ν_{\max} : 2963 (CH₃), 2142 (–N≡C), 1748 (C=O), 1238 (CH₂–O) cm⁻¹; $[\alpha]_D^{23} = +4.59$ (*c* 1.0, CHCl₃); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Metoda E: Procedura ogólna 6: Do roztworu *O*-acylo-*N*-formylo-L-leucynolu (187 mg, 1.0 mmol) w bezwodnym dichlorometanie (5 ml) dodano trifenylofosfinę (289 mg, 1.1 mmol), tatrachlorek węgla (102 μl, 1.05 mmol) i trietyloaminę (146 μl, 1.05 mmol). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano do temperatury wrzenia przez 3 godziny, ochłodzono do temperatury pokojowej, rozcieńczono dichlorometanem (10 ml) i przemyto wodą (2 × 10 ml). Fazę organiczną wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 98:2, v/v).

Wydajność 57%; 96.3 mg (0.57 mmol) lekko żółtego oleju; IR (film) ν_{\max} : 2960 (CH₃), 2142 (–N≡C), 1745 (C=O), 1235 (CH₂–O) cm⁻¹; $[\alpha]_D^{23} = +7.30$ (*c* 1.0, CHCl₃); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Octan (2*R*)-2-izocyjano-4-metylopentylu ((*R*)-45): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 6**. Wydajność 62%; 105.0 mg (0.62 mmol) lekko żółtego oleju; IR (film) ν_{\max} : 2962 (CH₃), 2142 (–N≡C), 1746 (C=O), 1237 (CH₂–O) cm⁻¹; $[\alpha]_D^{23} = -7.15$ (*c* 1.0, CHCl₃); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (*S*)-45.



8.10. Synteza mieszaniny epimerów (*S,S,S*)-1 i (*S,R,S*)-1

Reakcja Ugiego

Procedura ogólna 7: Do roztworu aldehydu (1 eq.) w metanolu (2 ml / 1 mmol) dodano aminę (1 eq.) i mieszano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Dodano kwas karboksylowy (1 eq.) rozpuszczony w metanolu (2 ml / 1 mmol). Po kolejnych 15 minutach dodano izocyjanek (1 eq.). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 dni, rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt (w postaci mieszaniny lub poszczególnych diastereoizomerów) wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej w gradiencie układów rozpuszczalników (żel krzemionowy, 230-400 mesh, heksan/EtOAc).

Reakcja usuwania grupy Dmb

Procedura ogólna 8. Do roztworu zabezpieczonego peptydu (lub mieszaniny diastereoizomerów) (1.0 mmol) w dichlorometanie (2 ml) dodano kwas trifluorooctowy (0.5 ml). Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze 50 °C. Mieszaninę ochłodzono do temperatury 0 °C i dodano nasycony roztwór wodorowęglanu sodu do momentu odbarwienia malinowego zabarwienia. Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (3 × 10 ml). Fazy organiczne połączono, przemyto wodą (20 ml) i solanką (20 ml) i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt (w postaci mieszaniny lub poszczególnych diastereoizomerów) wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, 70-230 mesh) (heksan/EtOAc).

Reakcja hydrolizy wiązania estrowego.

Procedura ogólna 9. Do roztworu estru (lub mieszaniny diastereoizomerów) (0.5 mmol) w metanolu (5 ml) dodano roztwór wodorotlenku sodu (1.25 mmol, 4 M). Reakcję prowadzono

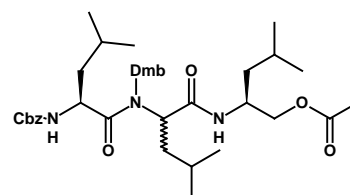
przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Metanol odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w octanie etylu (15 ml) i dodano kwas solny (15 ml, 1 M). Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano octanem etylu (2 × 15 ml). Fazy organiczne połączono, wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt (w postaci mieszaniny lub poszczególnych diastereoizomerów) wydzielono zgodnie z procedurą opisaną dla danej syntezy.

Reakcja utleniania alkoholu do aldehydu

Procedura ogólna 10. Do roztworu alkoholu (lub mieszaniny diastereoizomerów) (0.10 mmol) w dichlorometanie (2 ml) dodano reagent Dess-Martina (0.20 mmol). Reakcję prowadzono przez 1.5 godziny w temperaturze pokojowej. Dodano roztwór wodorotlenku sodu (2 ml, 5%) i mieszano przez kolejne 10 minut. Mieszaninę rozcieńczono wodą (10 ml) i dichlorometanem (10 ml), fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (3 × 10 ml). Fazy organiczne połączono, wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt (w postaci mieszaniny lub poszczególnych diastereoizomerów) wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, 70-230 mesh) (heksan/EtOAc).

Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-49 i (S,R,S)-49.

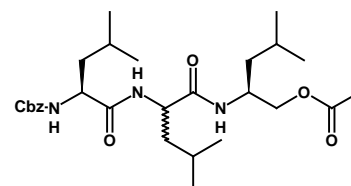
Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Wydajność 82%; 551 mg (0.82 mmol) bezbarwnego oleju; $R_{fI}=0.38$, $R_{fII}=0.30$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)



δ 0.70-1.05 (m, 18H), 1.10-1.35 (m, 3H), 1.35-1.70 (m, 6H), 1.85-2.05 (m, 3H), 3.78 (s, 6H), 3.87-4.05 (m, 1H), 4.05-4.25 (m, 2H), 4.26-4.45 (m, 1H), 4.46-4.70 (m, 1H), 4.73-4.95 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 6.35-6.52 (m, 2H), 6.70-6.80 (m, 1H), 6.98-7.20 (m, 2H), 7.34 (s, 5H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 20.7, 20.8, 22.1, 22.3, 22.6, 23.0, 23.5, 24.5, 24.7, 25.3, 36.9, 40.5, 42.4, 46.1, 50.2, 55.3, 55.4, 66.4, 66.9, 98.8, 103.6, 116.8, 128.1, 128.2, 128.6, 129.1, 136.4, 156.2, 158.0, 160.7, 170.1, 171.0, 175.6; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla C₃₇H₅₅N₅O₁₀Na [M+Na]⁺: 692.3881; zbadano, 692.3874; Czas retencji epimerów (Metoda D): $t_{RI}=10.29$ min, $t_{RII}=11.38$ min.

Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-50 i (S,R,S)-50.

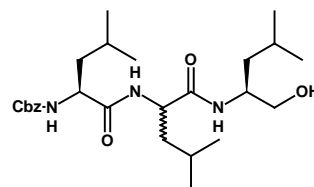
Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 8**. Wydajność 91%; 249 mg (0.48 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.29$ (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.80-



1.14 (m, 18H), 1.20-1.40 (m, 2H), 1.41-1.75 (m, 7H), 2.04 (d, $J=2.8$ Hz, 3H), 3.90-4.30 (m,

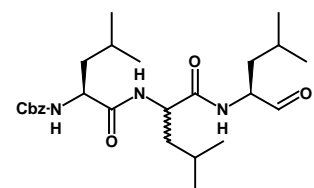
4H), 4.31-4.52 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.30-5.50 (m, 1H), 6.45-6.70 (m, 2H), 7.33 (s, 5H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 21.3, 22.4, 22.6, 23.4, 25.0, 40.8, 41.0, 42.1, 46.8, 47.8, 52.3, 66.5, 67.5, 128.3, 128.6, 128.9, 136.7, 170.9, 171.6, 172.5; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 542.3201; zbadano, 542.3176.

Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-51 i (S,R,S)-51. Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9**. Produkty użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczania. Wydajność 91%; 192.5 mg (0.40 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.19$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, =



95:5, v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.78-1.05 (m, 18H), 1.15-1.42 (m, 3H), 1.43-1.80 (m, 6H), 2.93 (br s, 1H), 3.30-3.70 (m, 2H), 3.90-4.08 (m, 1H), 4.10-4.28 (m, 1H), 4.30-4.55 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.40-5.58 (m, 1H), 5.60-5.73 (m, 1H), 6.65-6.70 (m, 1H), 7.25-7.45 (m, 5H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 22.3, 22.5, 23.2, 23.4, 25.1, 25.2, 40.2, 40.6, 40.9, 41.5, 50.5, 52.3, 54.3, 66.0, 67.6, 128.4, 128.7, 128.9, 136.3, 172.4, 173.0; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 500.3065; zbadano: 500.3113.

Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-1 i (S,R,S)-1. Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 88%; 44 mg (0.093 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.48$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1, v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.80-1.20 (m, 18H), 1.40-1.90

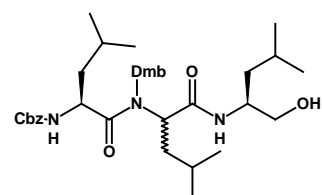


(m, 9H), 4.10-4.40 (m, 1H), 4.42-4.55 (m, 1H), 4.56-4.78 (m, 1H), 5.15 (s, 2H), 5.64-5.94 (m, 1H), 6.98-7.32 (m, 2H), 7.38 (s, 5H), 9.57 (s, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 22.1, 22.4, 22.5, 23.0, 23.2, 23.4, 25.0, 25.1, 37.7, 40.1, 41.0, 41.7, 51.8, 52.0, 53.9, 57.6, 67.4, 128.2, 128.5, 128.9, 136.4, 156.6, 172.5, 173.0, 199.9; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 498.2938; zbadano: 498.2936.

8.11. Katalizowana enzymatycznie hydroliza wiązania estrowego w mieszaninie diastereoizomerów (S,S,S)-49 i (S,R,S)-49 do alkoholi (S,S,S)-52 i (S,R,S)-52

8.11.1. Chemiczna hydroliza mieszaniny diastereoizomerów (S,S,S)-49 i (S,R,S)-49

Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Wydajność 95%; 75.3 mg (0.12 mmol) bezbarwnego oleju; $R_{fI} = 0.30$, $R_{fII} = 0.23$ (heksan/ EtOAc , 7:3, v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.69 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 0.76-1.04 (m, 16H), 1.12-1.32 (m, 3H), 1.33-1.86



(m, 6H), 2.82 (s, 1H), 3.20-3.70 (m, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.90-4.40 (m, 2H), 4.50-5.00 (m, 3H), 5.09 (s, 2H), 5.30-5.60 (m, 1H), 6.32-6.55 (m, 2H), 6.95-7.25 (m, 1H), 7.30-7.50 (m, 6H);

Analiza elementarna obliczona dla $C_{35}H_{53}N_3O_7 + 0.6 H_2O$: C, 65.83; H, 8.55; N, 6.58; Znaleziono: C, 65.71; H, 8.69; N, 6.38; Czas retencji epimerów (Metoda D): $t_{RI}=7.55$ min, $t_{RII}=8.78$ min.

8.11.2. Przegląd enzymów – dobór odpowiedniego enzymu jako katalizatora reakcji hydrolizy

Reakcje prowadzono w fiolkach o pojemności 4 ml. Do roztworu mieszaniny diastereoizomerów (*S,S,S*)-**49** i (*S,R,S*)-**49** (5 mg) w acetonie (0.4 ml) dodano bufor fosforanowy (1.6 ml, pH = 7.0) oraz enzym (1 mg). Jedna z próbek nie zawierała enzymu i stosowana była jako „ślepa próba”. Fiolki z próbkami były wytrząsane przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Produkt o największym stężeniu obserwowano w reakcji katalizowanej lipazą z kielków pszenicy.

8.11.3. Enzymatyczna hydroliza mieszaniny estrów (*S,S,S*)-**49** i (*S,R,S*)-**49** z zastosowaniem różnych rozpuszczalników organicznych

Mieszaninę diastereoizomerów (*S,S,S*)-**49** i (*S,R,S*)-**49** (50 mg) wytrząsano z lipazą z kielków pszenicy (5 mg) w układzie bufor fosforanowy (pH = 7.0) / rozpuszczalnik organiczny w proporcji 4:1 (20 ml). Mieszaninę reakcyjną wytrząsano przez 3 dni w temperaturze pokojowej, a następnie ekstrahowano octanem etylu (3×15 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono ($MgSO_4$). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Mieszaninę produktów (*S,S,S*)-**52** i (*S,R,S*)-**52** wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej. Skład mieszaniny określono za pomocą HPLC. Wyniki zebrano w Tabeli 5.

8.12. Synteza wszystkich stereoisomerów aldehydu Cbz-Leu-Leu-Leu-al (1)

8.12.1. Synteza aldehydów (*S,S,S*)-(+)-**1** i (*S,R,S*)-(–)-**1** oraz ich enancjomerów

Synteza związków (*S,S,S*)-(+)-**49** (Cbz-L-Leu-N(Dmb)-L-Leu-L-Leu-CH₂OAc) i (*S,R,S*)-(–)-**49** (Cbz-L-Leu-N(Dmb)-D-Leu-L-Leu-CH₂OAc). Produkty otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 7. Produkty (*S,S,S*)-(+)-**49** i (*S,R,S*)-(–)-**49** rozdzielono za pomocą trzykrotnej chromatografii kolumnowej. Związek (*S,S,S*)-(+)-**49**: Wydajność 35%; 459 mg (0.69 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.38$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.69 (d, $J=6.3$ Hz, 3H), 0.80-0.96 (m, 15H), 1.20-1.40 (m, 3H), 1.45-1.68 (m, 6H), 2.04 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.88 (dd, $J=6.0$ Hz, $J=11.1$ Hz, 1H), 3.96 (dd, $J=4.4$ Hz, $J=11.1$ Hz, 1H), 4.16 (oktet, $J=4.5$ Hz, 1H), 4.34 (d, $J=17.2$ Hz, 1H), 4.62 (t, $J=7.7$ Hz,

1H), 4.71 (d, $J=17.0$ Hz, 1H), 5.08 (q, $J=11.9$ Hz, 2H), 5.37 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J=3.9$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J=4.1$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.30-7.40 (m, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.7, 20.8, 22.0, 22.3, 22.6, 23.1, 23.5, 24.4, 24.7, 25.3, 36.9, 40.5, 42.3, 46.1, 50.2, 55.3, 55.4, 66.3, 66.9, 98.6, 103.8, 116.9, 128.0, 128.2, 128.5, 129.1, 136.2, 156.1, 158.0, 160.8, 170.2, 171.0, 175.3; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{37}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 692.3885; zbadano: 692.3862; $[\alpha]_D^{25} = +6.1$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda A): $t_R=17.42$ min. Związek (*S,R,S*)-(-)-**49**: Wydajność 33%; 438 mg (0.65 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.30$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.80-0.96 (m, 18H), 1.12-1.40 (m, 3H), 1.44-1.63 (m, 4H), 1.65 (m, 2H), 1.99 (s, 3H), 3.77 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.06-4.14 (m, 1H), 4.14-4.24 (m, 1H), 4.34 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 4.88 (t, $J=8.5$ Hz, 1H), 5.04-5.16 (m, 2H), 5.53 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 6.03 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.43-6.49 (m, 2H), 7.11 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.30-7.38 (m, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.7, 21.3, 22.3, 22.6, 22.7, 23.3, 23.5, 23.6, 24.3, 24.6, 25.3, 29.7, 37.0, 40.5, 43.1, 45.9, 50.4, 55.3, 55.4, 66.3, 66.7, 98.7, 104.4, 116.2, 127.9, 128.0, 128.1, 128.3, 128.5, 130.0, 136.4, 155.9, 158.2, 161.1, 170.3, 170.9, 173.4; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{37}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 692.3881; zbadano: 692.3885; $[\alpha]_D^{25} = -54.2$ (c 1.0, CHCl_3). Czas retencji (Metoda A): $t_R=15.39$ min.

Synteza związków (*R,R,R*)-(-)-49** (Cbz-D-Leu-N(Dmb)-D-Leu-D-Leu-CH₂OAc) i (*R,S,R*)-(+)-**49** (Cbz-D-Leu-N(Dmb)-L-Leu-D-Leu-CH₂OAc).** Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Produkty (*R,R,R*)-(-)-**49** i (*R,S,R*)-(+)-**49** rozdzielono za pomocą trzykrotnej chromatografii kolumnowej. Związek (*R,R,R*)-(-)-**49**: Wydajność 32%; 425 mg (0.64 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.37$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (*S,S,S*)-(+)-**49**; $[\alpha]_D^{25} = -5.3$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda A): $t_R=17.22$ min. Związek (*R,S,R*)-(+)-**49**: Wydajność 30%; 404 mg (0.60 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.30$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (*S,R,S*)-(-)-**49**; $[\alpha]_D^{25} = +62.9$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda A): $t_R=15.20$ min.

Synteza związku (*S,S,S*)-(+)-50** (Cbz-L-Leu-L-Leu-L-Leu-CH₂OAc).** Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 8**. Wydajność 91%; 265 mg (0.51 mmol) białych kryształów, t.t. 128-131 °C; $R_f = 0.25$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.87-0.97 (m, 18H), 1.26-1.33 (m, 1H), 1.37-1.45 (m, 1H), 1.45-1.55 (m, 2H), 1.56-1.71 (m, 4H), 1.74-1.85 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 4.00 (dd, $J=5.7$ Hz, $J=11.1$ Hz, 1H), 4.04-4.16 (m, 2H), 4.18-4.28 (m, 1H), 4.38-4.49 (m, 1H), 5.05 (d, $J=12.3$ Hz, 1H), 5.14 (d, $J=12.1$ Hz, 1H), 5.30 (d, $J=6.9$ Hz,

1H), 6.37 (d, $J=6.7$ Hz, 1H), 6.55 (br s, 1H), 7.30-7.39 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.9, 21.7, 22.0, 22.1, 22.8, 23.0, 24.7, 24.7, 24.9, 40.1, 40.3, 40.7, 46.8, 51.7, 54.1, 66.3, 67.2, 128.0, 128.3, 128.6, 135.9, 156.4, 171.2, 171.4, 172.2; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 542.3201; zbadano: 542.3193; $[\alpha]_D^{25} = +0.27$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda C) $t_R=6.31$ min.

Synteza związku (*R,R,R*)-(-)-50 (Cbz-D-Leu-D-Leu-D-Leu- CH_2OAc). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 8**. Wydajność 89%; 255 mg (0.49 mmol) białych kryształów, t.t. 127-130 °C; $R_f = 0.24$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (*S,S,S*)-(+)-50; $[\alpha]_D^{25} = -0.39$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda C) $t_R=6.42$ min.

Synteza związku (*S,R,S*)-(-)-50 (Cbz-L-Leu-D-Leu-L-Leu- CH_2OAc). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 8**. Wydajność 82%; 245 mg (0.47 mmol) białych kryształów, t.t. 144-146 °C; $R_f = 0.24$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.85-0.97 (m, 18H), 1.22-1.31 (m, 1H), 1.32-1.42 (m, 1H), 1.44-1.54 (m, 3H), 1.54-1.66 (m, 3H), 1.66-1.77 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 3.98-4.10 (m, 2H), 4.16-4.29 (m, 2H), 4.38 (q, $J=7.6$ Hz, 1H), 5.04-5.18 (m, 2H), 5.39 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.35 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.29-7.38 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.8, 22.0, 22.2, 22.6, 22.9, 23.0, 24.6, 24.8, 40.4, 40.6, 41.3, 46.4, 51.9, 53.6, 66.2, 67.1, 128.0, 128.3, 128.5, 136.0, 156.2, 171.0, 171.2, 172.2; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 542.3201; zbadano: 542.3175; $[\alpha]_D^{25} = -63.1$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda C) $t_R=5.99$ min.

Synteza związku (*R,S,R*)-(+)-50 (Cbz-D-Leu-L-Leu-D-Leu- CH_2OAc). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 8**. Wydajność 89%; 275 mg (0.55 mmol) białych kryształów, t.t. 147-148 °C; $R_f = 0.24$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (*S,R,S*)-(-)-50; $[\alpha]_D^{25} = +62.1$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda C) $t_R=6.12$ min.

Synteza związku (*S,S,S*)-(+)-51 (Cbz-L-Leu-L-Leu-L-Leu- CH_2OH). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9**. Wydajność 95%; 204 mg (0.43 mmol) białych kryształów; t.t. 111-113 °C; $R_f = 0.20$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.86-0.96 (m, 18H), 1.18-1.30 (m, 1H), 1.32-1.43 (m, 1H), 1.44-1.57 (m, 2H), 1.57-1.68 (m, 4H), 1.68-1.80 (m, 1H), 3.26 (br s, 1H), 3.38 (dd, $J=6.4$ Hz, $J=11.5$ Hz, 1H), 3.61 (dd, $J=3.4$ Hz, $J=11.4$ Hz, 1H), 3.96-4.09 (m, 1H), 4.10-4.18 (m, 1H), 4.42-4.52 (m, 1H), 5.02 (d, $J=12.3$ Hz, 1H), 5.11 (d, $J=12.2$ Hz, 1H), 5.68 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.25 (br s, 1H), 7.29-

7.36 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.9, 22.1, 22.8, 22.9, 23.1, 24.7, 24.8, 24.8, 39.9, 40.1, 41.0, 49.9, 52.0, 54.0, 65.2, 67.2, 128.0, 128.2, 128.5, 135.9, 156.6, 172.4, 173.1; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 500.3095; zbadano: 500.3093; $[\alpha]_D^{25} = +10.3$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda B) $t_R=4.73$ min.

Synteza związku (R,R,R)-(-)-51 (Cbz-D-Leu-D-Leu-D-Leu-CH₂OH). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9**. Wydajność 98%; 213 mg (0.45 mmol) białych kryształów; t.t. 109-112 °C; $R_f = 0.21$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (S,S,S)-(+)-51; $[\alpha]_D^{25} = -9.5$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda B) $t_R=4.80$ min.

Synteza związku (S,R,S)-(-)-51 (Cbz-L-Leu-D-Leu-L-Leu-CH₂OH). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9**. Wydajność 84%; 148 mg (0.31 mmol) białych kryształów; t.t. 161-163 °C; $R_f = 0.19$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.85-0.96 (m, 18H), 1.27-1.36 (m, 1H), 1.36-1.46 (m, 1H), 1.46-1.56 (m, 2H), 1.56-1.67 (m, 4H), 1.67-1.78 (m, 1H), 2.76 (br s, 1H), 3.52 (dd, $J=5.7$ Hz, $J=11.3$ Hz, 1H), 3.65 (dd, $J=3.5$ Hz, $J=11.3$ Hz, 1H), 3.95-4.07 (m, 1H), 4.12-4.22 (m, 1H), 4.35-4.44 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.47 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J=6.3$ Hz, 1H), 6.78 (d, $J=6.5$ Hz, 1H), 7.30-7.38 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 22.0, 22.1, 22.9, 23.0, 24.7, 24.8, 24.9, 39.8, 40.4, 41.1, 50.2, 52.4, 54.0, 65.6, 67.3, 128.1, 128.3, 128.6, 135.9, 156.5, 172.1, 172.7; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 500.3095; zbadano: 500.3087; $[\alpha]_D^{25} = -63.6$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda B) $t_R=4.47$ min.

Synteza związku (R,S,R)-(+)-51 (Cbz-D-Leu-L-Leu-D-Leu-CH₂OH). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9**. Wydajność 90%; 167 mg (0.35 mmol) białych kryształów; t.t. 162-163 °C; $R_f = 0.20$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (S,R,S)-(-)-51; $[\alpha]_D^{25} = +64.1$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda B) $t_R=4.52$ min.

Synteza aldehydu (S,S,S)-(+)-1 (Cbz-L-Leu-L-Leu-L-Leu-CHO). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 79%; 55 mg (0.12 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.22$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88-1.00 (m, 18H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.38-1.48 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.49-1.58 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.60-1.74 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.74-1.86 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.04-4.15 (m, 1H, CHCHO), 4.40-4.49 (m, 1H, NHCHO), 4.50-4.58 (m, 1H, NHCHO), 5.00-5.14 (m, 2H, OCH_2Ph), 5.29 (d, $J=6.4$ Hz, 1H, NHC(O)O), 6.59 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, NHCHCHO), 7.06 (d, $J=7.1$ Hz, 1H, NH), 7.29-

7.38 (m, 5H, ArH), 9.49 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.6, 21.7, 22.1, 22.7, 23.0, 23.1, 24.7, 24.7, 24.9, 37.4, 40.1, 40.6, 51.6, 54.1, 57.2, 67.3, 128.0, 128.3, 128.6, 135.8, 156.5, 172.2, 172.6, 199.8; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 498.2938; zbadano: 498.2943; $[\alpha]_D^{25} = +37.1$ (c 0.5, CHCl_3).

Synteza aldehydu (R,R,R)-(-)-1 (Cbz-D-Leu-D-Leu-D-Leu-CHO). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 76%; 35 mg (0.073 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.23$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88-0.96 (m, 18H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.35-1.47 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.47-1.57 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.58-1.74 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.74-1.86 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.05-4.15 (m, 1H, CHCHO), 4.38-4.49 (m, 1H, NHCHCO), 4.49-4.57 (m, 1H, NHCHCO), 4.98-5.15 (m, 2H, OCH_2Ph), 5.29 (d, $J=6.5$ Hz, 1H, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 6.56 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, NHCHCHO), 7.07 (d, $J=6.3$ Hz, 1H, NH), 7.29-7.38 (m, 5H, ArH), 9.49 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.6, 21.7, 22.1, 22.7, 23.0, 23.1, 24.7, 24.7, 24.9, 26.9, 37.4, 40.1, 40.7, 41.5, 51.6, 54.1, 57.2, 67.2, 128.0, 128.3, 128.6, 135.9, 156.5, 172.2, 172.6, 199.7; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 498.2938; zbadano: 498.2928; $[\alpha]_D^{25} = -36.5$ (c 0.5, CHCl_3).

Synteza aldehydu (S,R,S)-(-)-1 (Cbz-L-Leu-D-Leu-L-Leu-CHO). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 63%; 39 mg (0.082 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.22$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88-0.98 (m, 18H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.40-1.58 (m, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.59-1.79 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.12-4.22 (m, 1H, CHCHO), 4.40-4.54 (m, 2H, NHCHCO), 5.10 (s, 2H, OCH_2Ph), 5.24 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 6.50 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, NHCHCHO), 6.77 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, NH), 7.32-7.39 (m, 5H, ArH), 9.53 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.7, 21.9, 22.0, 22.8, 22.9, 23.1, 24.6, 24.7, 24.8, 37.6, 40.3, 41.1, 51.7, 53.7, 57.2, 67.3, 128.0, 128.3, 128.6, 135.9, 156.4, 171.9, 172.3, 199.6; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 498.2938; zbadano: 498.2951; $[\alpha]_D^{25} = -57.3$ (c 0.5, CHCl_3).

Synteza aldehydu (R,S,R)-(+)-1 (Cbz-D-Leu-L-Leu-D-Leu-CHO). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 25%; 15 mg (0,032 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.22$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.88-0.98 (m, 18H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.40-1.57 (m, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.58-1.79 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.12-4.22 (m, 1H, CHCHO), 4.40-4.52 (m, 2H, NHCHCO), 5.10 (s, 2H, OCH_2Ph), 5.28 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 6.53 (d, $J=6.2$ Hz, 1H, NHCHCHO), 6.77 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, NH), 7.30-7.38 (m, 5H, ArH), 9.52 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 21.8, 21.9, 22.0, 22.8, 22.9, 23.1, 24.7, 24.7, 24.8, 37.6, 40.4, 41.1, 51.8, 53.8, 57.3, 67.2, 128.0, 128.1, 128.3, 128.6,

128.6, 136.0, 156.4, 172.0, 172.4, 199.3; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $C_{27}H_{45}N_3O_6Na$ $[M+CH_3OH+Na]^+$: 530.3201; zbadano: 530.3177; $[\alpha]_D^{25} = +55.5$ (c 0.5, $CHCl_3$).

8.12.2. Synteza aldehydów (*R,I,S*)-(+)-1 i (*R,II,S*)-(-)-1 oraz ich enancjomerów

Synteza mieszaniny związków (*R,I,S*)-49 (Cbz-D-Leu-N(Dmb)-I-Leu-L-Leu-CH₂OAc) i (*R,II,S*)-49 (Cbz-D-Leu-N(Dmb)-II-Leu-L-Leu-CH₂OAc). Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Produkty (*R,I,S*)-49 i (*R,II,S*)-49 otrzymano jako mieszaninę o proporcji 51:49. Wydajność 82%; 1.098 g (1.64 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.65$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.70 (d, $J=6.4$ Hz, 2H), 0.74-1.06 (m, 16H), 1.06-1.40 (m, 3H), 1.40-1.70 (m, 6H), 2.03 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.85-4.45 (m, 3H), 4.50-5.0 (m, 3H), 5.02-5.15 (m, 2H), 5.34 (d, $J=6.9$ Hz, 0.5H), 5.53 (d, $J=6.8$ Hz, 0.5H), 6.02 (d, $J=7.2$ Hz, 0.5H), 6.35-6.50 (m, 2H), 6.71 (d, $J=7.0$ Hz, 0.5H), 7.04 (d, $J=7.4$ Hz, 0.5H), 7.12 (d, $J=7.5$ Hz, 0.5H), 7.35 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 21.2, 22.2, 22.5, 23.0, 23.4, 23.9, 25.0, 25.6, 37.3, 40.6, 42.7, 43.3, 45.8, 46.7, 50.5, 55.7, 58.6, 66.6, 67.1, 67.3, 99.0, 104.1, 117.2, 128.3, 128.8, 129.6, 156.4, 170.6, 171.2, 175.4; Analiza elementarna obliczona dla $C_{37}H_{55}N_3O_8$: C, 66.34; H, 8.28; N, 6.27; zbadana: C, 66.18; H, 8.34; N, 6.12; Czas retencji epimerów (Metoda A): $t_{R(I,S)-49}=19.48$ min; $t_{R(II,S)-49}=16.17$ min.

Synteza mieszaniny związków (*S,I,R*)-49 (Cbz-L-Leu-N(Dmb)-I-Leu-D-Leu-CH₂OAc) i (*S,II,R*)-49 (Cbz-L-Leu-N(Dmb)-II-Leu-D-Leu-CH₂OAc). Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Produkty (*S,I,R*)-49 i (*S,II,R*)-49 otrzymano jako mieszaninę o proporcji 51:49. Wydajność 76%; 1.018 g (1.52 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.64$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla mieszaniny epimerów (*R,I,S*)-49 i (*R,II,S*)-49; Czas retencji epimerów (Metoda A): $t_{R(S,I,R)-49}=19.23$ min; $t_{R(S,II,R)-49}=15.97$ min.

Synteza związków (*R,I,S*)-(+)-52 (Cbz-D-Leu-N(Dmb)-I-Leu-L-Leu-CH₂OH) i (*R,II,S*)-(-)-52 (Cbz-D-Leu-N(Dmb)-II-Leu-L-Leu-CH₂OH). Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9**. Produkty (*R,I,S*)-(+)-52 i (*R,II,S*)-(-)-52 rozdzielono za pomocą trzykrotnej chromatografii kolumnowej. Związek (*R,I,S*)-(+)-52: Wydajność 36%; 328 mg (0.52 mmol) białych kryształów; t.t. 80-83 °C; $R_f = 0.46$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.76 (d, $J=6.2$ Hz, 6H), 0.82-1.04 (m, 15H), 1.04-1.15 (m, 1H), 1.38-1.58 (m, 2H), 1.60-1.70 (m, 1H), 1.70-1.90 (m, 2H), 2.73 (br s, 1H), 3.13 (dd, $J=5.8$, $J=11.5$, 1H), 3.52 (dd, $J=2.6$ Hz, $J=11.5$ Hz, 1H), 3.81 (s, 6H), 3.86-3.95 (m, 1H), 4.07 (d, $J=14.9$ Hz, 1H), 4.84 (d, $J=14.7$ Hz, 1H), 5.02-5.11 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.41 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 5.54 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.50 (s, 2H), 7.24 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.28-7.41 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz,

CDCl₃) δ 20.9, 21.0, 21.3, 21.9, 22.0, 22.3, 23.0, 23.3, 23.5, 24.4, 24.8, 25.3, 37.4, 39.9, 41.9, 48.3, 49.3, 50.7, 55.4, 55.5, 58.4, 65.4, 66.9, 99.2, 104.6, 115.1, 128.0, 128.4, 131.8, 136.4, 156.7, 158.8, 161.7, 170.3, 172.9; Analiza elementarna obliczona dla C₃₅H₅₃N₃O₇: C, 66.96; H, 8.51; N, 6.69; zbadana: C, 66.84; H, 8.44; N, 6.48; $[\alpha]_D^{25} = +29.4$ (c 1.0, CHCl₃); Czas retencji (Metoda B) $t_R=14.18$ min. Związek (*R,II,S*)-(-)-**52**: Wydajność 25%; 225 mg (0.36 mmol) białych kryształów; t.t. 55-58 °C; $R_f = 0.34$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.73 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.81-0.94 (m, 15H), 1.20-1.44 (m, 3H), 1.46-1.68 (m, 6H), 2.42 (br s, 1H), 3.43 (dd, $J=6.1$ Hz, $J=11.3$ Hz, 1H), 3.59 (dd, $J=3.1$ Hz, $J=11.4$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.82-3.89 (m, 1H), 4.39 (d, $J=16.5$ Hz, 1H), 4.62-4.72 (m, 1H), 4.74 (d, $J=16.5$ Hz, 1H), 5.04-5.16 (m, 2H), 5.40 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 6.44 (s, 2H), 6.64 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.35 (s, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.9, 22.2, 22.2, 22.7, 23.0, 23.5, 24.5, 24.8, 25.3, 37.0, 39.7, 42.0, 46.0, 50.2, 50.7, 55.3, 55.4, 58.3, 65.9, 67.0, 98.7, 103.9, 116.5, 128.0, 128.1, 128.5, 129.7, 136.2, 156.3, 158.2, 161.0, 171.5, 175.1; Analiza elementarna obliczona dla C₃₅H₅₃N₃O₇: C, 66.96; H, 8.51; N, 6.69; zbadana: C, 66.63; H, 8.44; N, 6.45; $[\alpha]_D^{25} = -29.7$ (c 1.0, CHCl₃); Czas retencji (Metoda B) $t_R=11.42$ min.

Synteza związków (*S,I,R*)-(-)-52** (Cbz-L-Leu-N(Dmb)-I-Leu-D-Leu-CH₂OH) i (*S,II,R*)-(+)-**52** (Cbz-L-Leu-N(Dmb)-II-Leu-D-Leu-CH₂OH).** Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9**. Produkty (*S,I,R*)-(-)-**52** i (*S,II,R*)-(+)-**52** rozdzielono za pomocą trzykrotnej chromatografii kolumnowej. Związek (*S,I,R*)-(-)-**52**: Wydajność 33%; 313 mg (0.50 mmol) białych kryształów; t.t. 81-83 °C; $R_f = 0.46$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (*R,I,S*)-(+)-**52**; $[\alpha]_D^{25} = -19.3$ (c 1.0, CHCl₃); Czas retencji (Metoda B) $t_R=14.30$ min. Związek (*S,II,R*)-(+)-**52**: Wydajność 30%; 244 mg (0.39 mmol) białych kryształów; t.t. 56-57 °C; $R_f = 0.33$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (*R,II,S*)-(-)-**52**; $[\alpha]_D^{25} = +26.7$ (c 1.0, CHCl₃); Czas retencji (Metoda B) $t_R=11.58$ min.

Synteza związku (*R,I,S*)-(+)-51** (Cbz-D-Leu-I-Leu-L-Leu-CH₂OH).** Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 8**. Wydajność 49%; 73 mg (0.152 mmol) białych kryształów; t.t. 124-127 °C; $R_f = 0.21$ (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.88-0.96 (m, 18H), 1.24-1.34 (m, 1H), 1.38-1.46 (m, 1H), 1.46-1.56 (m, 2H), 1.56-1.69 (m, 4H), 1.70-1.79 (m, 1H), 2.77 (br s, 1H), 3.40-3.47 (m, 1H), 3.58-3.66 (m, 1H), 3.97-4.06 (m, 1H), 4.11-4.19 (m, 1H), 7.38-4.46 (m, 1H), 5.05 (d, $J=12.1$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 5.40 (d,

$J=5.2$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.30-7.37 (m, 5H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 21.8, 22.1, 22.8, 22.9, 23.0, 24.8, 24.9, 39.9, 40.3, 41.0, 50.1, 52.1, 54.2, 65.5, 67.4, 128.1, 128.3, 128.6, 135.9, 156.5, 172.2, 172.8; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 500.3095; zbadano: 500.3079; $[\alpha]_D^{25} = +38.4$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda B) $t_R=4.73$ min.

Synteza związku (*S,I,R*)-(-)-51 (Cbz-L-Leu-I-Leu-D-Leu-CH₂OH). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 8**. Wydajność 35%; 50 mg (0.105 mmol) białych kryształów; t.t. 125-127 °C; $R_f = 0.21$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla enancjomeru (*R,I,S*)-(+)-51; $[\alpha]_D^{25} = -35.2$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda B) $t_R=4.65$ min.

Synteza związku (*R,II,S*)-(-)-51 (Cbz-D-Leu-II-Leu-L-Leu-CH₂OH). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 8**. Wydajność 61%; 88 mg (0.184 mmol) białych kryształów; t.t. 107-109 °C; $R_f = 0.19$; ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.87-0.97 (m, 18H), 1.29-1.36 (m, 1H), 1.38-1.47 (m, 1H), 1.49-1.56 (m, 2H), 1.57-1.68 (m, 4H), 1.75-1.85 (m, 1H), 2.47 (br s, 1H), 3.44-3.51 (m, 1H), 3.62 (dd, $J=3.5$ Hz, $J=11.3$ Hz, 1H), 3.95-4.03 (m, 1H), 4.03-4.10 (m, 1H), 4.35-4.42 (m, 1H), 5.05 (d, $J=12.1$ Hz, 1H), 5.14 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 5.34 (br s, 1H), 6.43 (br s, 1H), 6.66 (br s, 1H), 7.30-7.38 (m, 5H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 21.6, 22.1, 22.2, 22.7, 23.0, 24.7, 24.8, 25.0, 29.7, 39.8, 40.4, 40.8, 50.2, 52.6, 54.3, 65.5, 67.4, 128.0, 128.3, 128.6, 135.8, 156.6, 172.0, 172.7; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 500.3095; zbadano: 500.3090; $[\alpha]_D^{25} = -24.0$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda B) $t_R=4.87$ min.

Synteza związku (*S,II,R*)-(+)-51 (Cbz-L-Leu-II-Leu-D-Leu-CH₂OH). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 8**. Wydajność 37%; 53 mg (0.110 mmol) białych kryształów; t.t. 105-108 °C; $R_f = 0.20$; ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); $[\alpha]_D^{25} = +26.2$ (c 1.0, CHCl_3); Czas retencji (Metoda B) $t_R=4.80$ min.

Synteza aldehydu (*R,I,S*)-(+)-1 (Cbz-D-Leu-I-Leu-L-Leu-CHO). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 45%; 33 mg (0.069 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.23$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.87-0.98 (m, 18H), 1.40-1.57 (m, 2H), 1.57-1.69 (m, 6H), 1.69-1.83 (m, 1H), 4.11-4.21 (m, 1H), 4.40-4.55 (m, 2H), 5.09 (s, 2H), 5.24 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 6.49 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J=6.5$ Hz, 1H), 7.30-7.38 (m, 5H), 9.49 (s, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 21.7, 21.8, 22.9, 22.9, 23.1, 24.7, 24.8, 24.9, 29.7, 37.4, 40.3, 41.0, 51.6, 54.2, 57.3, 67.4, 128.0, 128.0, 128.3, 128.6, 135.9,

156.6, 172.1, 172.3, 199.5; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $C_{27}H_{45}N_3O_6Na$ $[M+CH_3OH+Na]^+$: 530.3201; zbadano: 530.3212; $[\alpha]_D^{25} = +45.9$ (c 0.5, $CHCl_3$).

Synteza aldehydu (*S,I,R*)-(-)-1 (Cbz-L-Leu-I-Leu-D-Leu-CHO). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 40%; 19 mg (0.041 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.23$ ($CHCl_3/MeOH$, 95:5, v/v); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 0.80-1.02 (m, 18H), 1.42-1.57 (m, 2H), 1.58-1.69 (m, 6H), 1.69-1.82 (m, 1H), 4.13-4.20 (m, 1H), 4.40-4.56 (m, 2H), 5.09 (s, 2H), 5.30 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 7.30-7.38 (m, 5H), 9.48 (s, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 21.7, 21.8, 22.8, 22.9, 23.1, 24.7, 24.8, 24.9, 29.7, 37.4, 40.3, 41.0, 51.6, 54.2, 57.3, 67.4, 128.0, 128.1, 128.4, 128.6, 135.9, 156.6, 172.1, 172.4, 199.6; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $C_{26}H_{41}N_3O_5Na$ $[M+Na]^+$: 498.2938; zbadano: 498.2947; $[\alpha]_D^{25} = -47.1$ (c 0.5, $CHCl_3$).

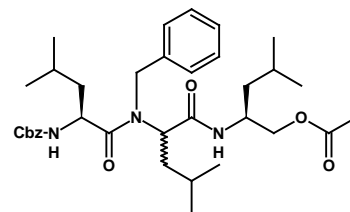
Synteza aldehydu (*R,II,S*)-(-)-1 (Cbz-D-Leu-II-Leu-L-Leu-CHO). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 56%; 30 mg (0.063 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.21$ ($CHCl_3/MeOH$, 95:5, v/v); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.86-0.99 (m, 18H), 1.39-1.57 (m, 2H), 1.58-1.73 (m, 6H), 1.75-1.85 (m, 1H), 4.04-4.15 (m, 1H), 4.38-4.46 (m, 1H), 4.46-4.58 (m, 1H), 4.97-5.06 (m, 1H), 5.06-5.13 (m, 1H), 5.25 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J=6.5$ Hz, 1H), 7.07 (br s, 1H), 7.30-7.36 (m, 5H), 9.45 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 21.6, 21.7, 22.1, 22.8, 23.0, 23.1, 23.1, 24.7, 24.7, 24.9, 40.3, 40.9, 51.8, 54.2, 57.2, 67.3, 128.0, 128.3, 128.6, 135.9, 156.5, 172.1, 172.5, 199.5; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $C_{26}H_{41}N_3O_5Na$ $[M+Na]^+$: 498.2938; zbadano: 498.2937; $[\alpha]_D^{25} = -27.1$ (c 0.5, $CHCl_3$).

Synteza aldehydu (*S,II,R*)-(-)-1 (Cbz-L-Leu-II-Leu-D-Leu-CHO). Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 32%; 15 mg (0.031 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.22$ ($CHCl_3/MeOH$, 95:5, v/v); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 0.89-0.97 (m, 18H), 1.40-1.58 (m, 2H), 1.60-1.72 (m, 6H), 1.74-1.85 (m, 1H), 4.06-4.14 (m, 1H), 4.39-4.45 (m, 1H), 4.46-4.54 (m, 1H), 4.98-5.05 (m, 1H), 5.07-5.12 (m, 1H), 5.28 (d, $J=6.5$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.00 (br s, 1H), 7.29-7.38 (m, 5H), 9.49 (s, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 21.7, 21.7, 22.1, 22.7, 23.0, 23.1, 24.7, 24.7, 24.9, 37.4, 40.4, 41.0, 51.9, 54.2, 57.2, 67.3, 128.0, 128.3, 128.6, 135.9, 156.5, 172.1, 172.5, 199.6; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $C_{26}H_{41}N_3O_5Na$ $[M+Na]^+$: 498.2938; zbadano: 498.2945; $[\alpha]_D^{25} = +29.0$ (c 0.5, $CHCl_3$).

8.13. Synteza aldehydów 56 z grupami zabezpieczającymi wiązanie amidowe

Synteza mieszaniny związków (*S,S,S*)-54b i (*S,R,S*)-54b.

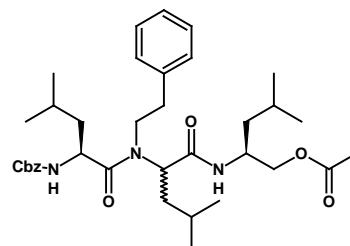
Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Wydajność 42%; 129 mg (0.21 mmol); bezbarwnego oleju; $R_{fI} = 0.53$, $R_{fII} = 0.61$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 0.41 (d, $J=6.2$ Hz, 1H), 0.64 (m, 18H), 1.03-1.17 (m, 1H), 1.20-



1.36 (m, 2H), 1.37-1.72 (m, 5H), 1.74-1.94 (m, 1H), 2.04 (d, $J=2.0$ Hz, 3H), 3.84-4.38 (m, 3H), 4.40-4.54 (m, 1H), 4.55-5.00 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 5.20-5.54 (m, 1H), 6.68 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 7.15-7.50 (m, 10H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 21.2, 22.4, 22.9, 23.4, 22.8, 24.6, 24.9, 25.1, 25.6, 25.8, 27.2, 37.4, 40.8, 46.6, 46.8, 50.6, 57.7, 65.4, 66.6, 67.4, 126.8, 128.0, 128.3, 128.5, 128.4, 128.9, 129.2, 137.7, 170.2, 17.2, 176.1; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_6$: C, 68.94; H, 8.43; N, 6.89; zbadana: C, 68.97; H, 8.61; N, 6.96.

Synteza mieszaniny związków (*S,S,S*)-54c i (*S,R,S*)-54c.

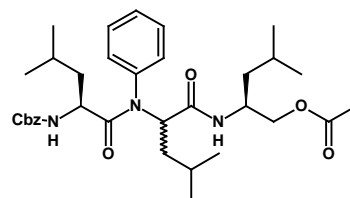
Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Wydajność 56%; 111 mg (0.18 mmol) bezbarwnego oleju; $R_{fI} = 0.29$, $R_{fII} = 0.39$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 0.78-1.08 (m, 18H), 1.16-1.74 (m, 7H), 1.79 (s, 2H), 2.04 (s,



3H), 2.70-3.05 (m, 2H), 3.30-3.49 (m, 1H), 3.50-3.80 (m, 1H), 3.82-4.25 (m, 1H), 4.26-4.40 (m, 2H), 4.50-4.90 (m, 1H), 4.95-5.10 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.35-5.55 (m, 1H), 6.55 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J=5.2$ Hz, 4H), 7.35 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 20.8, 21.8, 22.2, 22.4, 23.3, 23.8, 25.0, 25.2, 25.4, 27.0, 36.9, 37.5, 41.0, 46.9, 50.5, 55.8, 66.5, 67.4, 127.1, 128.3, 128.5, 128.7, 128.9, 129.0, 129.1, 138.0, 161.0, 170.7, 170.8, 173.4, 175.3; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_6$: C, 69.31; H, 8.56; N, 6.74; zbadana: C, 69.15; H, 8.73; N, 6.76.

Synteza mieszaniny związków (*S,S,S*)-54d i (*S,R,S*)-54d.

Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Mieszaninę doczyszczono z zastosowaniem preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (heksan/EtOAc, 8:2, v/v). Wydajność 50%;

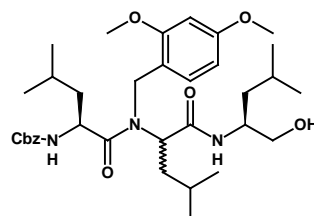


93 mg (0.16 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.49$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 0.25 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 0.43 (t, $J=6.1$ Hz, 1H), 0.70 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 0.82 (t, $J=5.4$ Hz, 2H), 0.82 (d, $J=6.2$ Hz, 2H), 0.91 (t, $J=5.4$ Hz, 9H), 1.18-1.76 (m, 9H), 2.06 (d, $J=3.2$ Hz, 3H), 3.34-3.82 (m, 1H), 3.88-4.21 (m, 3H), 4.22-4.50 (m, 2H), 4.73-5.10 (m, 3H), 5.12-5.42 (m, 2H), 7.20-7.54 (m, 10H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 20.4, 21.0, 21.2, 22.0,

22.4, 22.6, 22.8, 23.0, 23.4, 23.7, 23.7, 24.5, 24.9, 25.1, 25.3, 30.0, 37.4, 40.8, 41.9, 46.5, 47.0, 50.9, 51.3, 58.4, 66.8, 67.2, 128.2, 128.4, 128.8, 129.2, 129.4, 129.8, 136.5, 137.8, 138.1, 156.5, 161.0, 170.1, 171.2, 174.9; Analiza elementarna obliczona dla $C_{34}H_{49}N_3O_6$: C, 68.54; H, 8.29; N, 7.05; zbadana: C, 68.61; H, 8.40; N, 7.00.

Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-55a i (S,R,S)-55a.

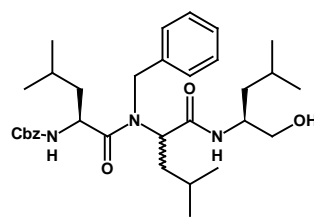
Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9** i użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 95%; 75.3 mg (0.12 mmol) bezbarwnego oleju; $R_{fI} = 0.23$, $R_{fII} = 0.35$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 0.69 (d,



$J=6.4$ Hz, 2H), 0.76-1.04 (m, 16H), 1.12-1.32 (m, 3H), 1.33-1.86 (m, 6H), 1.88-2.04 (m, 1H), 2.82 (br s, 1H), 3.20-3.70 (m, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.90-4.40 (m, 2H), 4.50-5.00 (m, 3H), 5.09 (s, 2H), 5.30-5.60 (m, 1H), 6.32-6.55 (m, 2H), 6.95-7.25 (m, 1H), 7.30-7.50 (m, 5H); Analiza elementarna obliczona dla $C_{35}H_{53}N_3O_7 + 2 H_2O$: C, 65.09; H, 8.58; N, 6.51; zbadana: C, 65.17; H, 8.69; N, 6.38.

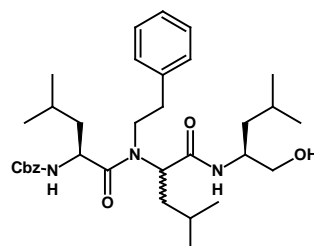
Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-55b i (S,R,S)-55b.

Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9** i użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 98%; 54.1 mg (0.095 mmol) bezbarwnego oleju; $R_{fI} = 0.23$, $R_{fII} = 0.35$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Analiza elementarna obliczona dla $C_{33}H_{49}N_3O_5 + 3 H_2O$: C, 66.64; H, 8.81; N, 7.06; zbadana: C, 66.57; H, 8.79; N, 6.89.



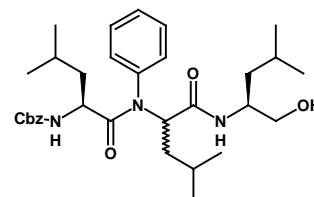
Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-55c i (S,R,S)-55c.

Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9** i użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 95%; 61.6 mg (0.106 mmol) bezbarwnego oleju; $R_{fI} = 0.23$, $R_{fII} = 0.43$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Analiza elementarna obliczona dla $C_{34}H_{51}N_3O_5 + 0.5 H_2O$: C, 69.12; H, 8.87; N, 7.11; zbadana: C, 69.11; H, 9.01; N, 6.96.



Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-55d i (S,R,S)-55d.

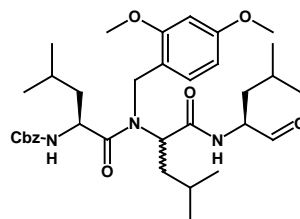
Produkty otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9** i użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 94%; 55.8 mg (0.10 mmol) bezbarwnego oleju; $R_{fI} = 0.23$, $R_{fII} = 0.35$



(heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Analiza elementarna obliczona dla $C_{32}H_{47}N_3O_5 + 0.5 H_2O$: C, 68.30; H, 8.60; N, 7.47; zbadana: C, 68.30; H, 8.69; N, 7.21.

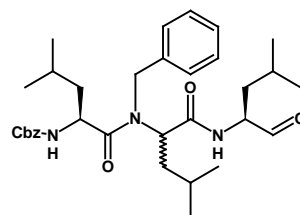
Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-56a i (S,R,S)-56a. Produkty

otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 89%; 40.0 mg (0.064 mmol); $R_{fI} = 0.56$, $R_{fII} = 0.64$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.65-1.05 (m, 18H), 1.06-1.20 (m, 3H), 1.21-1.80 (m, 5H), 1.82-2.10 (m, 1H), 3.75-3.85 (m, 6H), 4.00-4.50 (m, 3H), 4.51-4.95 (m, 2H), 4.96-5.05 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.40-5.70 (m, 1H), 6.30-6.55 (m, 2H), 7.00-7.14 (m, 1H), 7.15-7.45 (m, 5H), 9.24 (s, 1H); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_7$: C, 67.17; H, 8.21; N, 6.71; zbadana: C, 67.01; H, 8.20; N, 6.39.



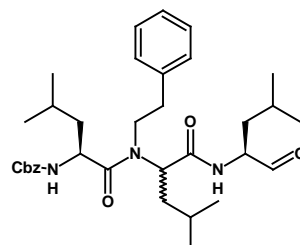
Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-56b i (S,R,S)-56b. Produkty

otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 73%; 30.0 mg (0.053 mmol) bezbarwnego oleju; $R_{fI} = 0.47$, $R_{fII} = 0.55$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.37-0.47 (m, 1H), 0.65-1.02 (m, 16H), 1.03-1.20 (m, 1H), 1.30-1.90 (m, 8H), 1.92-2.15 (m, 1H), 4.00-5.00 (m, 5H), 5.01-5.12 (m, 2H), 5.13-5.60 (m, 1H), 7.05-7.15 (m, 1H), 7.16-7.50 (m, 10H), 9.41 (s, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 21.0, 22.1, 22.9, 23.5, 23.7, 24.6, 24.8, 25.1, 25.8, 37.5, 37.8, 40.5, 46.9, 50.3, 57.6, 67.5, 97.3, 127.0, 128.0, 128.2, 128.4, 128.9, 129.0, 129.2, 137.5, 170.3, 171.0, 200.2; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_5 + 0.4 \text{H}_2\text{O}$: C, 69.18; H, 8.41; N, 7.33; zbadana: C, 69.19; H, 8.45; N, 7.16.



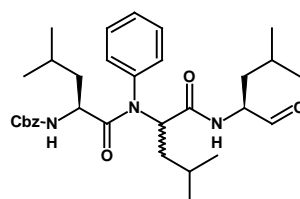
Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-56c i (S,R,S)-56c. Produkty

otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 81%; 37.0 mg (0.064 mmol) bezbarwnego oleju; $R_{fI} = 0.40$, $R_{fII} = 0.53$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.82-1.04 (m, 18H), 1.20-1.32 (m, 1H), 1.32-1.52 (m, 2H), 1.54-1.84 (m, 5H), 1.86-2.04 (m, 1H), 2.86-2.98 (m, 2H), 3.34-3.46 (m, 1H), 3.60-3.75 (m, 1H), 4.35-4.45 (m, 1H), 4.76-4.86 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.13-5.20 (m, 1H), 5.44 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.20-7.40 (m, 10H), 9.49 (s, 1H); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_5 + 0.7 \text{H}_2\text{O}$: C, 68.94; H, 8.58; N, 7.09; zbadana: C, 68.95; H, 8.33; N, 7.09.



Synteza mieszaniny związków (S,S,S)-56d i (S,R,S)-56d. Produkty

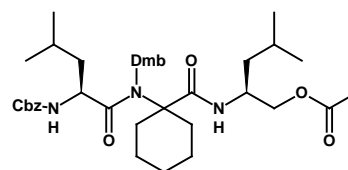
otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 71%; 32.4 mg (0.059 mmol) bezbarwnego oleju; $R_{fI} = 0.34$, $R_{fII} = 0.42$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.26 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 0.48 (d, $J=6.1$ Hz, 1H), 0.70 (d, $J=6.7$ Hz, 1H), 0.82 (d, $J=6.7$ Hz, 1H), 0.85 (t, $J=6.8$ Hz, 3H), 0.93-1.02 (m, 7H), 1.05-1.85 (m, 10H), 4.10-4.18 (m, 1H), 4.38-4.56 (m, 1H),



5.00-5.16 (m, 2H), 5.17-5.30 (m, 1H), 7.01 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.20-7.27 (m, 1H), 7.30-7.55 (m, 10H), 9.59 (d, $J=10.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.0, 20.6, 21.5, 21.8, 22.4, 22.6, 22.7, 23.1, 23.2, 23.3, 23.4, 24.1, 24.5, 24.6, 24.8, 24.9, 36.9, 37.5, 41.5, 41.7, 50.5, 51.0, 57.2, 57.3, 66.9, 127.9, 128.1, 128.5, 129.0, 129.2, 129.5, 130.4, 136.2, 137.7, 156.2, 170.8, 171.4, 174.8, 199.6, 200.0; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_5 + 0.5 \text{H}_2\text{O}$: C, 68.54; H, 8.27; N, 7.49; zbadana: C, 68.63; H, 8.27; N, 7.39.

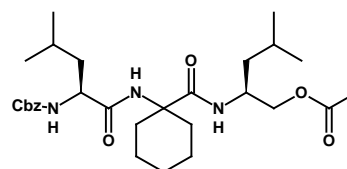
8.14. Reakcje Ugiego z zastosowaniem ketonów jako reagentów karboksylowych

Synteza związku 63. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Wydajność 66%; 224 mg (0.33 mmol) białych

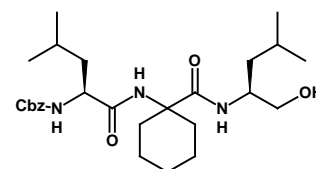


kryształów; t.t. 35-40 °C; $R_f = 0.59$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.74-1.00 (m, 12H), 1.04-1.82 (m, 16H), 1.99 (s, 3H), 2.14-2.32 (m, 1H), 2.33-2.52 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.88-4.82 (m, 5H), 5.04-5.12 (m, 2H), 5.44 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.2 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.40-6.54 (m, 2H), 7.20-7.30 (m, 1H), 7.34 (s, 4H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 14.5, 21.1, 21.6, 22.4, 23.2, 23.5, 23.9, 24.9, 25.7, 32.6, 33.1, 41.0, 42.9, 43.7, 46.5, 51.7, 55.7, 66.9, 67.1, 99.0, 104.6, 118.7, 128.3, 128.8, 160.7, 171.2, 172.9, 175.3; $[\alpha]_D^{25} = -24.2$ (c 1.0, CHCl_3); HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]$: 704.3881; zbadano: 704.3898.

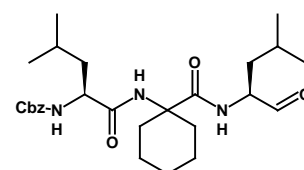
Synteza związku 70. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 8** i użyto do kolejnej reakcji. Wydajność 42%; 42 mg (0.08 mmol) bezbarwnego oleju. $R_f = 0.51$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_6$: C, 65.51; H, 8.53; N, 7.90; zbadana: C, 65.33; H, 8.50; N, 7.67.



Synteza związku 71. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9** i użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 100%; 38.3 mg (0.07 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.32$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v).



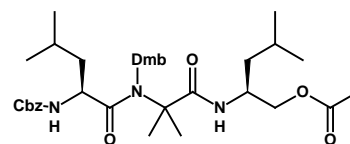
Synteza związku 72. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 77%; 26.4 mg (0.054 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.59$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.80-1.05 (m, 12H), 1.20-2.24 (m, 16H), 3.95-4.15 (m,



1H), 4.26-5.46 (m, 1H), 5.03-5.20 (m, 4H), 6.05-6.20 (m, 1H), 7.34 (s, 5H), 9.49 (d, $J=6.4$

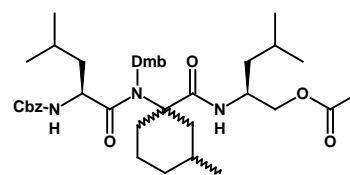
Hz, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 21.7, 21.8, 22.0, 22.8, 22.9, 23.8, 24.7, 24.8, 25.2, 29.7, 37.5, 40.3, 41.6, 52.7, 54.2, 57.3, 67.9, 128.0, 128.1, 128.3, 128.6, 135.7, 157.0, 172.2, 172.5, 199.8; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5$: C, 66.50; H, 8.47; N, 8.62; zbadano: C, 66.29; H, 8.49; N, 8.49.

Synteza związku 64. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Wydajność 35%; 0.23 g (0.35 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.46$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ^1H NMR (200 MHz,



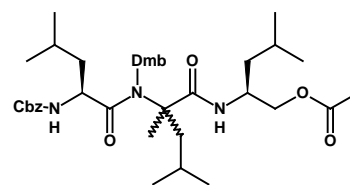
CDCl_3) δ 0.73 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 0.80-0.98 (m, 8H), 1.21-1.75 (m, 14H), 2.01 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.01 (d, $J=4.8$ Hz, 2H), 4.16-4.84 (m, 2H), 5.05-5.16 (m, 2H), 5.46 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 5.74 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.44-6.54 (m, 2H), 7.34 (s, 6H), 7.46 (d, $J=8.4$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 21.2, 21.5, 22.6, 23.4, 23.9, 24.9, 41.0, 43.0, 46.9, 51.1, 57.7, 66.7, 67.1, 98.9, 104.6, 118.8, 128.3, 128.4, 128.8, 160.7, 171.4, 174.4; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_8$: C, 65.50; H, 8.01; N, 6.55; zbadana: C, 65.66; H, 8.29; N, 6.33.

Synteza związku 65. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Wydajność 67%; 0.46 g (0.67 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.55$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ^1H NMR (200 MHz,



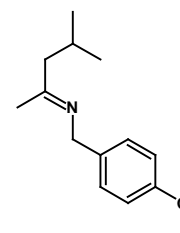
CDCl_3) δ 0.70-1.05 (m, 18H), 1.10-2.90 (m, 15H), 3.78 (s, 6H), 3.86-5.06 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 5.30-5.50 (m, 1H), 5.50-5.65 (m, 1H), 5.96-6.12 (m, 1H), 6.40-6.72 (m, 3H), 7.14-7.22 (m, 1H), 7.34 (s, 4H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 21.1, 22.4, 23.2, 23.5, 24.0, 24.9, 29.3, 34.6, 39.1, 41.1, 46.5, 51.5, 55.7, 67.1, 67.3, 67.9, 99.2, 104.7, 114.9, 118.9, 128.4, 128.8, 160.5, 171.1, 174.4; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{39}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_8$: C, 67.31; H, 8.26; N, 6.04; zbadana: C, 67.47; H, 8.45; N, 5.96.

Synteza związku 66. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**. Wydajność 6%; 42 mg (0.06 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.68$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ^1H NMR (200 MHz,



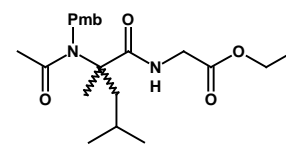
CDCl_3) δ 0.60 (d, $J=6.6$ Hz, 2H), 0.74-1.02 (m, 16H), 1.16-1.88 (m, 12H), 1.92-2.12 (m, 4H), 3.70-3.86 (m, 6H), 3.92-5.02 (m, 5H), 5.04-5.14 (m, 2H), 5.44 (dd, $J=9.4$ Hz, $J=33$ Hz, 1H), 5.75 (t, $J=9.3$ Hz, 1H), 6.42-6.58 (m, 2H), 7.33 (s, 5H), 7.62 (dd, $J=8.3$ Hz, $J=54.7$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 21.2, 22.1, 22.5, 23.3, 24.2, 24.9, 25.1, 25.7, 29.1, 30.6, 41.1, 43.1, 44.6, 46.9, 51.4, 55.7, 66.6, 67.1, 98.8, 104.6, 118.7, 128.2, 128.3, 128.8, 129.1, 156.3, 160.6, 171.3, 174.1; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_8 + 1.0 \text{H}_2\text{O}$: C, 65.03; H, 8.47; N, 5.90; zbadana: C, 65.07; H, 8.51; N, 5.62.

1-(4-Metoksyfenylo)-N-[4-metylopentan-2-ylideno]metyloamina (68): Do mieszaniny ketonu metyloizobutyloвого (11 g, 110 mmol) i toluenu (30 ml) dodano 4-metoksybenzyloaminę (13.7 g, 100 mmol). Mieszaninę reakcyjną przez 20 godzin ogrzewano pod chłodnicą zwrotną do temperatury 160 °C oddestylowując azeotropowo wodę w aparaturze Deana-Starka.



Mieszaninę ochłodzono, rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono z zastosowaniem destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 68%; 15.02 g (68 mmol) żółtego oleju; t. wrz. 82-100 °C (0.3-0.5 mmHg); $R_f = 0.05$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.02 (t, $J=6.5$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.95 (s, 3H, $\text{N}=\text{CCH}_3$), 2.00-2.20 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.27 (d, $J=6.2$ Hz, 2H, CH_2CH), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 4.50 (s, 2H, CH_2Ar), 6.93 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.30 (d, $J=8.2$ Hz, 2H, ArH); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 22.8, 23.1, 26.5, 41.6, 52.2, 54.8, 55.5, 114.0, 114.1, 129.0, 129.1, 133.1, 158.5, 170.1; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}$: C, 76.67; H, 9.65; N, 6.39; zbadana: C, 76.27; H, 9.83; N, 6.30.

Synteza związku 69. Do roztworu iminy **68** (222 mg, 1 mmol) w etanolu (2 ml) w temperaturze pokojowej dodano kwas octowy (57 μl , 1 mmol). Po 15 minutach dodano izocyjanooctan etylu (109 μl , 1 mmol). Po 20 godzinach rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej. Wydajność 14%; 56.2 mg (0.14 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.63$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 6:4, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 0.91 (dd, $J=2.4$ Hz, $J=6.4$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.28 (t, 3H, $J=7.1$ Hz, CH_2CH_3), 1.44 (s, 3H, CCH_3), 1.60-1.78 (m, 3H, CH_2CH), 2.07 (s, 3H, COCH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.04 (dd, $J=2.6$ Hz, $J=4.8$ Hz, 2H, NHCH_2), 4.21 (q, $J=7.0$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.58 (d, $J=5.8$ Hz, 2H, NCH_2), 6.31 (t, $J=3.8$ Hz, 1H, NH), 6.92, (dt, $J=2.3$ Hz, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.44 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 14.5, 22.5, 23.7, 24.2, 25.0, 25.7, 42.2, 44.5, 48.9, 55.6, 61.8, 65.5, 114.7, 127.6, 130.7, 159.1, 170.7, 172.4, 175.0; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5 + 0.5 \text{H}_2\text{O}$: C, 62.82; H, 8.28; N, 6.98; zbadana: C, 63.03; H, 8.39; N, 6.89.

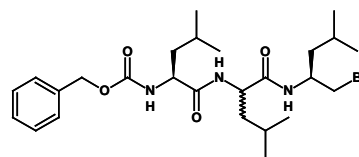


8.15. Synteza tripeptydów z innymi niż aldehydowa grupami C-końcowymi

8.15.1. Synteza tripeptydów z ugrupowaniem soli tiomocznikowej

Synteza mieszaniny związków (*S,S,S*)-75 i (*S,R,S*)-75. Do

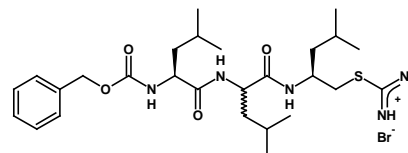
roztworu mieszaniny alkoholi (*S,S,S*)-51 i (*S,R,S*)-51 (195 mg, 0.41 mmol) w dichlorometanie (6 ml) dodano tetrabromek węgla (272 mg, 0.82 mol). Mieszaninę schłodzono do



temperatury 5 °C po czym wkraplano roztwór trifenylofosfiny (270 mg, 1.03 mmol) w dichlorometanie (4 ml) przez 15 minut. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano stopniowo do temperatury pokojowej przez 1 godzinę, następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej. Wydajność 71%; 158 mg (0.29 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.75$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 0.74-1.05 (m, 18H, $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 1.35-1.80 (m, 9H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.30-3.65 (m, 2H, CH_2Br), 4.08-4.36 (m, 2H, $\text{NHCHC}(\text{O})$), 4.38-4.58 (m, 1H, $\text{CHNHC}(\text{O})\text{O}$), 5.09 (s, 2H, CH_2Ph), 5.50-5.70 (m, 1H, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 6.96 (dt, $J=9.0$ Hz, $J=44.7$ Hz, 1H, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 7.32 (s, 5H, ArH), 8.30 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 22.2, 22.4, 22.5, 22.6, 25.0, 25.1, 37.9, 38.3, 40.6, 41.3, 42.0, 47.7, 48.1, 52.2, 53.8, 67.5, 127.9, 128.3, 128.6, 128.9, 136.3, 156.7, 171.7, 172.2, 173.4; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}$: C, 57.77; H, 7.83; N, 7.77; zbadana: C, 57.34; H, 7.70; N, 7.56.

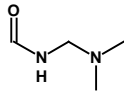
Synteza mieszaniny związków (*S,S,S*)-78 i (*S,R,S*)-78.

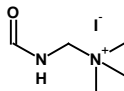
Mieszaninę bromków (*S,S,S*)-75 i (*S,R,S*)-75 (61 mg, 0.113 mmol) i tiomocznika (8.5 mg, 0.112 mmol) w suchym etanolu (6 ml) ogrzewano do temperatury 60 °C przez 24

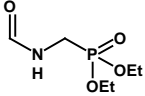


godziny. Mieszaninę ochłodzono, rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej. Wydajność 37%; 26 mg (0.042 mmol) żółtego krystalizującego oleju; $R_f = 0.75$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.86-1.00 (m, 18H), 1.20-1.35 (m, 3H), 1.53-1.80 (m, 6H), 2.75-2.90 (m, 1H), 3.20-2.32 (m, 1H), 3.64-4.00 (m, 2H), 4.12-4.50 (m, 2H), 5.02-5.17 (m, 2H), 5.94 (br s, 1H), 7.37 (s, 5H), 7.50 (br s, 1H), 7.77 (br s, 1H), 8.54-9.30 (m, 2H), 10.8 (br s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 8.6, 14.1, 21.2, 21.7, 22.9, 23.0, 23.3, 24.8, 25.0, 29.7, 31.9, 34.9, 39.6, 40.8, 41.1, 46.1, 49.0, 53.1, 54.5, 55.8, 67.3, 127.9, 128.6, 135.8, 156.8, 171.4, 173.4, 174.4; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_4\text{S} [\text{M}-\text{Br}]^+$: 536.3265; zbadano: 536.3281.

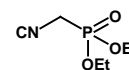
8.15.2. Synteza tripeptydów z ugrupowaniem estru kwasu fosfonowego

***N*-((Dimetyloamino)metylo)formamid (83a):** Mieszaninę formaldehydu (4 ml, 0.1 mmol) i wodnego roztworu dimetyloaminy (12.6 ml, 0.1 mmol, 40%)  schłodzono do temperatury 5 °C po czym wkraplano wodny roztwór formaldehydu (7.9 ml, 0.1 mmol, 35-37%) przez 10 minut. Mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez 20 godzin, po czym zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w dichlorometanie (50 ml), wysuszono (MgSO₄) i rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałego oleistego osadu dodano eter etylowy (50 ml) i ogrzewano do temperatury wrzenia przez 30 minut. Roztwór oddzielono od osadu i ochłodzono do temperatury -70 °C. Wytrącone kryształy produktu odsączono. Wydajność 56%; 5.672 g (55.5 mmol) białych kryształów; t.t. 55-59 °C (lit.¹⁹⁹ 65); ¹H NMR (200 MHz, d₆-DMSO) δ 2.10 (s, 6H, N(CH₃)₂), 3.84 (dd, proporcja 3:1, *J*=6.1 Hz, *J*=13.3 Hz, 2H, CH₂), 8.12 (s, 1H, HCO), 8.21 (br s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, d₆-DMSO) δ 59.4, 64.1, 161.6, 165.3.

Jodek formamido-*N,N,N*-trimetylometanoamoniowy (84a). Do roztworu *N*-((dimetyloamino)metylo)formamidu (3.40 g, 33.3 mmol) w metanolu (35 ml)  dodano w jednej porcji jodek metylu (2.07 ml, 33.3 mmol). Temperatura mieszaniny reakcyjnej wzrosła z 17 do 27 °C. Po 10 minutach zaczął wytrącać się biały osad. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Wytrącone kryształy produktu odsączono. Wydajność 73%; 5,95 g (24.4 mmol) białych kryształów; t.t. 152-155 °C (lit.¹⁹⁹ 151-156); ¹H NMR (200 MHz, d₆-DMSO) δ 2.96 (s, 9H, N(CH₃)₃), 4.68 (dd, proporcja 1:5, *J*=7.5 Hz, *J*=26.1 Hz, 2H, CH₂), 8.29 (s, 1H, HCO), 9.33 (br s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, d₆-DMSO) δ 49.7, 65.0, 163.1, 166.0; Analiza elementarna obliczona dla C₅H₁₃N₂O: C, 24.60; H, 5.37; N, 11.48; zbadana: C, 24.70; H, 5.42; N, 11.31.

(Formamidometylo)fosfonian dietylu (85a). Mieszaninę jodku formamido-*N,N,N*-trimetylometanoamoniowego (3.75 g, 15.4 mmol) i fosforanu (III)  trietylu (4 ml, 23.1 mmol) w nitrometanie (25 ml) ogrzewano do temperatury wrzenia przez 3 godziny. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej, dodano eter etylowy (25 ml) i odsączono wytrącony osad. Przesącz zatężono do objętości 30 ml i schłodzono. Wytrącony biały osad odsączono. Przesącz zatężono i przedestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując produkt. Wydajność 88%; 2.66 g (13.6 mmol) bezbarwnego oleju; t. wrz. 160 °C (1.5 mmHg).

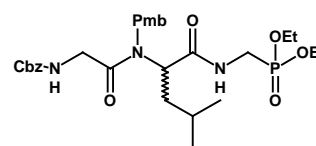
(Izocyjanometylo)fosfonian dietylu (86): Do mieszaniny (formamidometylo)-



fosfonianu dietylu (2.65 g, 13.6 mmol) i trietyloaminy (5.7 ml, 40.8 mmol) w dichlorometanie (30 ml) schłodzonej do temperatury -45 °C dodawano przez 5 minut roztwór tlenochlorku fosforu (1.4 ml, 15.0 mmol) w dichlorometanie (5 ml). Mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury pokojowej, mieszano przez 3 godziny, wylano na schłodzony wodny roztwór wodorowęglanu sodu (30 ml, 1 M) z lodem. Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (2 × 20 ml), fazy organiczne połączono, wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzieloni za pomocą destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 43%; 1.05 g (5.9 mmol) bezbarwnego oleju; t. wrz. 105 °C (1 mmHg) (lit.¹⁹⁹ 90 (0.2)); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.40 (t, *J*=7.2 Hz, 6H), 3.78 (d, *J*=16.0 Hz, 2H), 4.27 (dq, *J*=7.0 Hz, *J*=7.8 Hz, 4H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 16.6, 16.7, 36.3, 41.1, 64.3, 64.4; IR (film) ν_{\max} : 2985, 2153 (NC), 1256 (P=O), 1025 (P-O).

Synteza związku 87a: Produkt otrzymany zgodnie z **Procedurą**

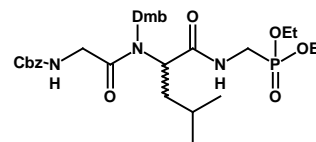
ogólną 7: Czas reakcji wydłużono do 7 dni. Wydajność 72%; 0.214 g (0.36 mmol) bezbarwnego oleju; *R_f* = 0.36 (CHCl₃/MeOH, 9:1,



v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.85 (dd, *J*=4.3 Hz, *J*=5.9 Hz, 6H), 1.30 (dt, *J*=1.6 Hz, *J*=7.0 Hz, 6H), 1.38-1.60 (m, 2H), 1.76-2.02 (m, 1H), 3.40-3.74 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.90-4.02 (m, 2H), 4.10 (qu, *J*=7.2 Hz, 4H), 4.52 (s, 2H), 4.95-5.05 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.86 (br s, 1H), 6.86 (d, *J*=8.4 Hz, 3H), 7.09 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.33 (s, 5H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 16.7, 16.8, 22.6, 23.2, 25.5, 33.4, 36.5, 37.5, 43.7, 48.0, 55.6, 57.0, 62.8, 62.9, 67.3, 97.3, 114.7, 127.6, 128.3, 128.4, 128.8, 171.1; Analiza elementarna obliczona dla C₂₉H₄₂N₃O₈P: C, 58.87; H, 7.16; N, 7.10; zbadana: C, 58.59; H, 7.79; N, 6.97.

Synteza związku 87b: Produkt otrzymany zgodnie z **Procedurą**

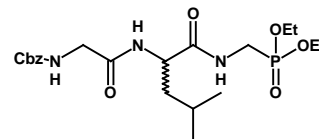
ogólną 7: Czas reakcji wydłużono do 6 dni. Wydajność 70%; 0.436 g (0.70 mmol) bezbarwnego oleju; *R_f* = 0.44 (CHCl₃/MeOH, 9:1,



v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.76-0.94 (m, 6H), 1.29 (t, *J*=7.0 Hz, 6H), 1.40-1.62 (m, 2H), 1.80-2.00 (m, 1H), 3.56 (dt, *J*=6.1 Hz, *J*=11.0 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.08 (dqu, *J*=2.8 Hz, *J*=7.4 Hz, 6H), 4.40 (s, 2H), 4.66 (t, *J*=6.3 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 5.79 (br s, 1H), 6.38-6.50 (m, 2H), 6.76 (br s, 1H), 6.98 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.34 (s, 5H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 16.6, 16.7, 22.8, 22.9, 25.5, 33.4, 36.5, 37.2, 43.5, 45.2, 55.7, 57.7, 62.8, 63.0, 67.2, 99.1, 104.5, 116.2, 128.3, 128.4, 128.8, 129.2, 136.7, 161.2, 170.6; Analiza elementarna

obliczona dla $C_{30}H_{44}N_3O_9P + 1.3 H_2O$: C, 55.86; H, 7.28; N, 6.51; zbadana: C, 55.87; H, 6.83; N, 6.15.

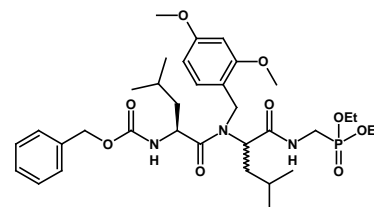
Synteza związku 88b: Do roztworu związku **87b** (100 mg, 0.16 mmol) w dichlorometanie (5 ml) dodano kwas trifluoroctowy (0.5 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze wrzenia przez



3 godziny i w temperaturze pokojowej przez kolejne 16 godzin. W trakcie reakcji mieszanina zmieniała barwę na fioletową. Do mieszaniny reakcyjnej dodano nasycony roztwór wodorowęglanu sodu do momentu odbarwienia fioletowego zabarwienia (10 ml), rozcieńczono wodą (10 ml) i ekstrahowano dichlorometanem (4×10 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono ($MgSO_4$). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej ($CHCl_3/MeOH$, 99:1, v/v). Wydajność 63%; 45 mg (0.10 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.34$ ($CHCl_3/MeOH$, 95:5, v/v); 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 0.89 (s, 6H), 1.27 (t, $J=7.0$ Hz, 6H), 1.42-1.76 (m, 3H), 3.66 (dt, $J=5.9$ Hz, $J=12.4$ Hz, 2H), 3.80-3.96 (m, 2H), 4.08 (qu, $J=7.2$ Hz, 4H), 4.54-4.76 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 6.18 (br s, 1H), 7.09 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.33 (s, 5H), 7.58 (br s, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 16.6, 16.7, 22.5, 23.1, 25.0, 30.0, 33.4, 36.6, 41.7, 44.7, 52.0, 62.9, 63.0, 63.2, 67.4, 128.4, 128.5, 128.8, 136.6, 157.0, 169.7, 172.5; HRMS-ESI: (m/z) obliczone dla $C_{21}H_{34}N_3O_7NaP [M+Na]^+$: 494.2027; zbadane: 494.2047.

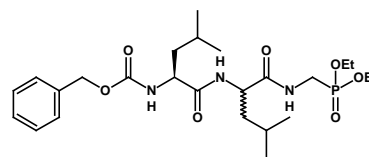
Synteza związku 87c: Produkt otrzymany zgodnie z

Procedurą ogólną 7: Wydajność 72%; 244.8 mg (0.36 mmol) wiśniowego oleju; $R_f = 0.41$ ($CHCl_3/MeOH$, 95:5, v/v); 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 0.84 (d, $J=7.0$ Hz, 6H,



$CH(CH_3)_2$), 0.87 (d, $J=7.0$ Hz, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.28 (t, $J=7.1$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 1.40-1.78 (m, 4H, $CHCH_2CH$), 1.79-2.00 (m, 2H, $CH(CH_3)_2$), 3.56 (dd, $J=6.3$ Hz, $J=11.4$ Hz, 2H, CH_2P), 3.72-3.90 (m, 6H, OCH_3), 4.06 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.09 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.26-4.68 (m, 2H, NCH_2Ar), 4.70-4.95 (m, 2H, $CHC=O$), 5.10 (s, 2H, OCH_2Ph), 5.62 (t, $J=8.5$ Hz, 1H, $NHC(=O)O$), 6.45 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 6.61 (br s, 1H, NH), 6.82 (br s, 1H, NH), 7.05 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.35 (s, 5H, C_6H_5); ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 16.7, 16.8, 21.7, 23.1, 23.9, 24.9, 25.4, 33.4, 37.0, 38.3, 43.2, 50.8, 55.7, 62.8, 67.2, 98.9, 104.2, 128.3, 128.3, 128.8, 130.0, 159.4, 169.5; Analiza elementarna obliczona dla $C_{34}H_{52}N_3O_9P + 0.4 H_2O$: C, 59.62; H, 7.77; N, 6.13; zbadana: C, 59.50; H, 7.67; N, 7.83.

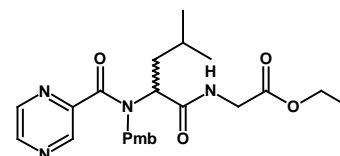
Synteza związku 88c: Do roztworu związku **87c** (122 mg, 0.18 mmol) w dichloroetanie (5 ml) dodano kwas trifluorooctowy (0.5 ml). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano do



temperatury wrzenia przez 3 godziny, ochłodzono i dodano wodny nasycony roztwór wodorowęglanu sodu do odbarwienia mieszaniny. Mieszaninę rozcieńczono wodą (10 ml) i ekstrahowano dichlorometanem (4 × 10 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej. Wydajność 61%; 59 mg (0.11 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.39$ (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.76-1.02 (m, 12H, CH(CH₃)), 1.24 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.29 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.40-1.76 (m, 6H, CH₂CH(CH₃)₂), 3.79 (dt, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂P), 3.94-4.18 (m, 4H, CH₂CH₃), 4.24 (q, $J=7.2$ Hz, 1H, NHCHC(O)NHCH₂), 4.60-4.76 (m, 1H, CHNHC(O)O), 5.09 (s, 2H, CH₂Ph), 6.17 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, NHC(O)O), 6.99 (dd, $J=8.3$ Hz, $J=23.8$ Hz, 1H, NHCH₂), 7.32 (s, 5H, ArH), 7.62-7.80 (m, 1H, NHCH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 16.6, 16.7, 22.2, 22.4, 22.6, 23.0, 23.1, 23.3, 24.9, 25.0, 33.3, 36.5, 41.9, 51.8, 54.0, 62.9, 63.0, 67.2, 128.3, 128.4, 128.8, 136.7, 156.6, 172.5, 172.8; Analiza elementarna obliczona dla C₂₅H₄₂N₃O₇P + 0.7 H₂O: C, 55.58; H, 8.10; N, 7.78; zbadana: C, 55.63; H, 8.29; N, 7.57.

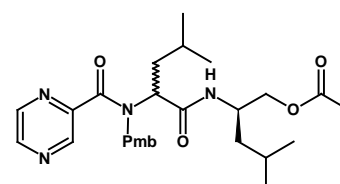
8.16. Synteza dipeptydów z N-końcową grupą 2-pirazynokarbonylową

Synteza związku 90. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**: Wydajność 88%; 0.388 g (0.88 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.20$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz,



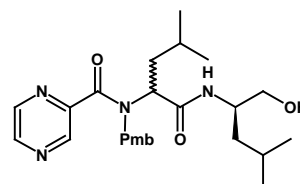
CDCl₃) δ 0.50 (d, $J=6.4$ Hz, 2H), 0.69 (d, $J=6.4$ Hz, 2H), 0.90 (d, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.30 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.40-1.64 (m, 1H), 1.70-2.00 (m, 2H), 3.52-3.70 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.92-4.15 (m, 1H), 4.22 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.40-5.00 (m, 3H), 6.60-6.90 (m, 1H), 7.00-7.25 (m, 1H), 7.34 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 8.45-8.90 (m, 3H), 9.13 (s, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.4, 21.8, 23.1, 37.0, 41.8, 46.1, 55.5, 58.9, 61.7, 113.8, 130.4, 141.8, 146.5, 147.0, 172.4, 174.3; Analiza elementarna obliczona dla C₂₃H₃₀N₄O₅ + 0.3 H₂O: C, 61.67; H, 6.89; N, 12.51; zbadana: C, 61.61; H, 6.98; N, 12.27.

Synteza związku 91. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 7**: Wydajność 82%; 0.407 g (0.82 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.25$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz,



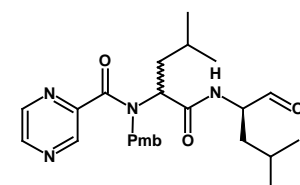
CDCl₃) δ 0.48 (d, *J*=6.6 Hz, 2H), 0.60 (dd, *J*=1.8 Hz, *J*=6.6 Hz, 2H), 0.80-1.04 (m, 8H), 1.05-1.90 (m, 6H), 2.07 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.80-3.92 (m, 1H), 3.94-4.30 (m, 2H), 4.42-4.56 (m, 1H), 4.56-4.70 (m, 2H), 4.72-4.88 (m, 1H), 6.64-6.76 (m, 1H), 6.82 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.00 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.86 (t, *J*=8.6 Hz, 1H), 8.40-8.60 (m, 1H), 8.62-8.80 (m, 1H), 9.12 (s, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 21.2, 22.6, 23.0, 23.4, 24.5, 25.1, 25.5, 37.4, 41.3, 46.6, 46.8, 55.5, 59.8, 66.3, 114.1, 129.1, 130.3, 141.3, 142.7, 145.5, 146.5, 147.2, 169.6, 171.2; Analiza elementarna obliczona dla C₂₇H₃₈N₄O₅ + 0.4 H₂O: C, 64.11; H, 7.73; N, 10.08; zbadana: C, 64.10; H, 7.82; N, 10.90.

Synteza związku 92. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 9**. Produkt użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 100%, 115 mg (0.25 mmol) bezbarwnego oleju.



Synteza związku 93. Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 10**. Wydajność 94%; 47 mg (0.10 mmol) bezbarwnego oleju;

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.50 (d, *J*=6.4 Hz, 2H), 0.66 (d, *J*=6.6 Hz, 2H), 0.74-1.10 (m, 8H), 1.20-2.10 (m, 6H), 3.77 (s, 3H),



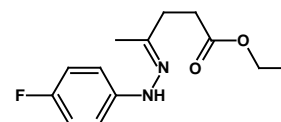
4.00-4.60 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.70-5.00 (m, 1H), 6.60-6.95 (m, 2H), 7.04 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.25-7.50 (m, 2H), 8.40-8.70 (m, 1H), 8.41-9.00 (m, 1H), 9.15 (s, 1H), 9.60 (s, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 21.9, 23.2, 23.4, 24.4, 25.2, 29.7, 30.0, 37.3, 38.2, 38.5, 46.3, 55.6, 57.9, 59.3, 97.3, 114.0, 129.4, 130.3, 130.4, 141.7, 142.8, 145.7, 146.7, 170.2, 199.7; HRMS-ESI: (*m/z*) obliczone dla C₂₅H₃₄N₄O₄Na [M+Na]⁺: 477.2472; zbadane, 477.2465.

8.17. Synteza reagenta karboksylowego z ugrupowaniem indolowym

Synteza związku 99. W roztworze octanu sodu (2,77 g, 33,8 mmol)

w kwasie octowym (60 ml, 1 M) podgrzany do temperatury 75 °C

rozpuszczono chlorowodorek 4-fluorofenylohydrazyny (5 g, 30,7



mmol). Do mieszaniny reakcyjnej dodano lewulinian etylu (5,24 ml, 36,8 mmol).

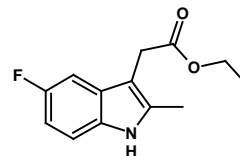
Temperaturę podniesiono do 85 °C. Lewulinian rozpuścił się i wytrącił się pomarańczowy osad. Po 20 minutach mieszaninę ochłodzono. Wytrącony osad produktu odsączono i przemyto wodą. Produkt użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność

90%; 7.02 g (27.8 mmol) pomarańczowego osadu; dwa izomery *E* i *Z*; R_I = 0.59, R_{II} = 0.63 (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.32 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.83 (s, 3H, N=CCH₃), 2.60-2.95 (m, 4H, CH₂CH₂), 4.20 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 6.95-

7.15 (m, 4H, ArH), 7.78-7.88 (m, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 14.6, 15.5, 30.8, 33.6, 60.7, 114.0, 114.2, 115.6, 116.1, 142.6, 173.7.

Synteza związku 100

Metoda A: Do roztworu stężonego kwasu siarkowego (0.25 ml) w bezwodnym etanolu (3 ml) dodano hydrazon **99** (252 mg, 1.0 ml).



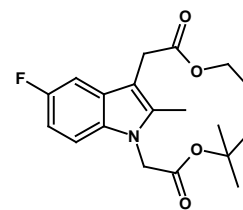
Mieszaninę reakcyjną ogrzewano do temperatury wrzenia przez 3 godziny. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej i dodawano kroplami roztwór wodorotlenku sodu (ok. 10 ml, 1M) do osiągnięcia $\text{pH} = 6$. Ekstrahowano dichlorometanem (2×25 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 5:5, v/v). Wydajność 44%; (103 mg, 0.44 mmol) lekko żółtego oleju; $R_f = 0.45$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.24 (t, $J=7.1$ Hz, CH_2CH_3), 2.33 (s, 3H, CCH_3), 3.62 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 4.13 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 6.82 (dt, $J=2.4$ Hz, $J=9.1$ Hz, 1H, ArH(4)), 7.09 (dd, $J=4.4$ Hz, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH(6) lub ArH(7)), 7.16 (dd, $J=2.4$ Hz, $J=9.8$ Hz, 1H, ArH(7) lub ArH(6)), 7.5 (br s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 12.1, 14.6, 30.8, 61.2, 103.3, 103.8, 105.1, 109.2, 109.7, 111.0, 111.2, 131.9, 135.0, 155.9, 160.5, 172.3; IR (film w CHCl_3) ν_{max} : 3368, 2983, 1722, 1588, 1488, 1177 cm^{-1} ; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{FNO}_2$: C, 66.37; H, 6.00; N, 5.95; zbadana: C, 66.17; H, 6.25; N, 5.67.

Metoda B:

Do zawiesiny chlorowodoru 4-fluorofenylhydrazyny (3.0 g, 18.5 mmol) w lodowatym kwasie octowym (50 ml) dodano lewulinian etylu (3 ml, 21.0 mmol). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano do temperatury wrzenia przez 3 godziny, następnie ochłodzono do temperatury pokojowej. Kwas octowy odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano wodę (50 ml) i ekstrahowano octanem etylu (3×50 ml). Fazy organiczne połączono i przemyto kolejno nasyconym roztworem wodorowęglanem sodu (50 ml), kwasem solnym (50 ml, 1 M), wodą (50 ml) i solanką (50 ml) i wysuszono (MgSO_4). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując produkt, który użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia. Wydajność 100%; 4.4 g (18.5 mmol) brązowego oleju. $R_f = 0.48$ (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Synteza związku 101.

Metoda A: Do zawiesiny wodoru sodu (41 mg, 1.02 mmol, 60% zawiesina w oleju) w dimetyloformamidzie (0.5 ml) ochłodzonego do temperatury 0 °C dodano kroplami roztwór indolu **100** (151 mg, 0.68 mmol) w dimetyloformamidzie (2 ml). Po 45 minutach mieszaninę

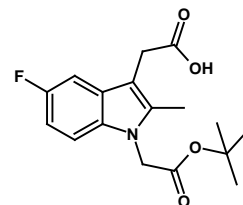


przeniesiono strzykawką do roztworu chlorooctanu *tert*-butylu (146 μ l, 1.02 mmol) w dimetyloformamidzie (1 ml) schłodzonego do temperatury 0 °C. Mieszanina reakcyjna była mieszana przez 1.5 godziny w temperaturze pokojowej. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano wodę (10 ml) i ekstrahowano octanem etylu (4 \times 15 ml). Fazy organiczne połączono, wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono z zastosowaniem chromatografii kolumnowej (heksan/EtOAc, 95:5, v/v). Wydajność 45%; 100 mg (0.29 mmol) żółtego krystalizującego oleju; t.t. 77-79 °C; R_f = 0.61 (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.23 (t, J =7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.35 (s, 3H, CCH₃), 3.65 (s, 2H, CH₂C=O), 4.12 (q, J =7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.65 (s, 2H, NCH₂), 6.88 (dt, J =2.4 Hz, J =9.1 Hz, 1H, ArH(4)), 7.07 (dd, J =4.1 Hz, J =8.7 Hz, 1H, ArH(6) lub ArH(7)), 7.20 (dd, J =2.3 Hz, J =9.7 Hz, 1H, ArH(7) lub ArH(6)); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 10.7, 14.6, 28.3, 31.1, 46.2, 61.1, 82.9, 103.7, 104.2, 105.5, 109.1, 109.3, 109.8, 128.6, 133.3, 136.3, 156.1, 160.7, 167.9, 172.1; IR (film w CHCl₃) ν_{\max} : 2981, 1736, 1483, 1156 cm⁻¹; Analiza elementarna obliczona dla C₁₉H₂₄FNO₄: C, 65.31; H, 6.92; N, 4.01; zbadana: C, 65.02; H, 7.09; N, 3.73.

Metoda B: Do zawiesiny wodoru sodu (1.13 g, 28.2 mmol, 60% zawiesina w oleju) w dimetyloformamidzie (5 ml) ochłodzonego do temperatury 0 °C dodano kroplami roztwór indolu **100** (4.42 g, 18.8 mmol) w dimetyloformamidzie (10 ml) nie dopuszczając do wzrostu temperatury powyżej 10 °C. Po 45 minutach mieszaninę przeniesiono do roztworu bromooctanu *tert*-butylu (4.16 ml, 28.2 mmol) w dimetyloformamidzie (15 ml) schłodzonego do temp 0 °C. Mieszanina reakcyjna była mieszana przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej po czym rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano wodę (75 ml) i ekstrahowano octanem etylu (4 \times 40 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałego żółtego oleju dodano etanol (40 ml). Mieszaninę ochłodzono do temperatury -70 °C pozostawiając na noc. Wykrystalizowany produkt odsączono. Wydajność 70%; 4.574 g (13.1 mmol) jasno żółtych kryształów; t.t. 78-79 °C; R_f

= 0.61 (heksan/EtOAc, 7:3, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Synteza związku 96. Do schłodzonego do temperatury 0 °C roztworu diestru **101** (349 mg, 1.0 mmol) w mieszaninie tetrahydrofuranu (2.5 ml) i etanolu (2.5 ml) dodano roztwór wodorotlenku potasu (2.5 ml, 2.50 mmol, 1 M). Mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury pokojowej i

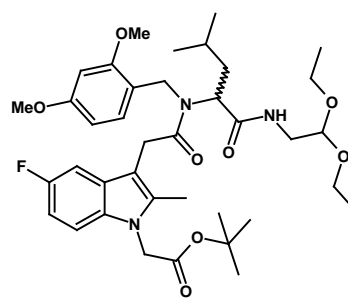


mieszano przez 1.5 godziny po czym dodano wodę (30 ml) i eter etylowy (30 ml). Fazy rozdzielono, fazę organiczną ekstrahowano wodą (30 ml). Fazy wodne połączono, dodano roztwór kwasu solnego (1 M) do osiągnięcia pH = 6-7 i ekstrahowano eterem etylowym (2 × 30 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono z zastosowaniem chromatografii kolumnowej (CHCl₃/MeOH, 98:2, v/v). Wydajność 38%; 122 mg (0.38 mmol) żółtego krystalizującego oleju; R_f = 0.29 (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.33 (s, 3H, CCH₃), 3.68 (s, 2H, CH₂C=O), 4.65 (s, 2H, NCH₂), 6.88 (dt, J=2.4 Hz, J=9.2 Hz, 1H, ArH(4)), 7.07 (dd, J=4.2 Hz, J=8.8 Hz, 1H, ArH(6) lub ArH(7)), 7.17 (dd, J=2.4 Hz, J=9.8 Hz, 1H, ArH(7) lub ArH(6)); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 10.2, 27.8, 30.4, 45.6, 82.3, 103.1, 103.6, 108.5, 108.7, 108.9, 109.0, 132.8, 135.9, 160.8, 167.4, 173.6; Analiza elementarna obliczona dla C₁₇H₂₀FNO₄: C, 63.54; H, 6.27; N, 4.36; zbadana: C, 63.39; H, 6.40; N, 4.23.

8.18. Reakcje Ugiego z zastosowaniem kwasu 96 z ugrupowaniem indolowym

Synteza związku 103: Produkt otrzymano zgodnie z

Procedurą ogólną 7. Wydajność 80%: 292 mg (0.40 mmol) bezbarwnego oleju; R_f = 0.62 (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.81-0.85 (m, 6H), 1.17 (dt, J=4.4 Hz, J=7.0 Hz, 6H), 1.42 (d, J=2.6 Hz, 9H), 1.45-1.57 (m, 2H), 1.81-1.91 (m, 1H), 2.23 (d, J=6.6 Hz, 3H), 3.11 (dt, J=5.8 Hz,



J=13.6 Hz, 1H), 3.27 (dt, J=5.6 Hz, J=13.9 Hz, 1H), 3.44-3.52 (m, 2H), 3.60-3.67 (m, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.30-4.40 (m, 1H), 4.42-4.44 (m, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.49-4.55 (m, 2H), 4.63 (d, J=4.76 Hz, 2H), 4.80-4.90 (m, 1H), 6.46-6.50 (m, 2H), 6.82-6.89 (m, 1H), 7.02-7.08 (m, 2H), 7.12 (dd, J=2.4 Hz, J=9.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 10.3, 10.4, 15.3, 18.4, 22.6, 25.1, 25.2, 27.9, 31.2, 31.5, 36.4, 36.7, 45.9, 49.8, 55.2, 55.4, 56.7, 58.4, 62.5, 82.6, 98.6, 100.7, 103.6, 103.9, 105.3, 108.7, 108.9, 109.0, 109.2, 117.6,

128.2, 157.1, 157.7, 158.9, 160.6, 167.5, 171.2, 173.6; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $C_{38}H_{54}N_3O_8FNa$ [$M+Na$] $^+$: 722.3787; zbadano: 722.3768.

Synteza związku 105: Produkt otrzymano zgodnie z

Procedurą ogólną 7. Wydajność 74%: 335 mg (0.46 mmol)

bezbarwnego oleju; $R_f = 0.65$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); 1H

NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 0.77-0.87 (m, 12H), 1.09- 1.17 (m,

2H), 1.42 (s, 9H), 1.43-1.52 (m, 2H), 1.65-1.80 (m, 1H), 1.82-

1.94 (m, 1H), 1.98 (d, $J=26.8$ Hz, 3H), 2.21 (s, 3H), 3.44-3.49

(m, 1H), 3.64-3.74 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.95-4.02 (m, 1H), 4.04-4.13 (m, 1H),

4.38 (d, $J=17.61$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J=17.61$ Hz, 1H), 4.52-4.60 (m, 1H), 4.61-4.64 (m, 2H),

4.72-4.90 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.51 (t, $J=2.2$ Hz, 1H), 6.86 (dt, $J=2.2$ Hz, $J=9.0$ Hz, 1H),

7.04 (dt, $J=4.2$ Hz, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J=2.4$ Hz, $J=9.7$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J=2.6$ Hz,

$J=9.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 10.3, 10.3, 20.6, 20.7, 21.9, 22.0, 22.4, 22.4,

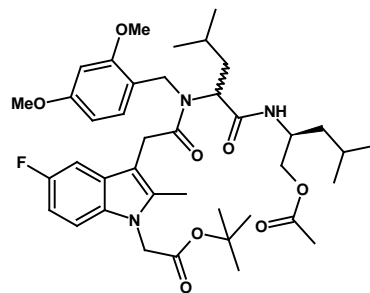
22.7, 22.7, 22.8, 22.9, 24.7, 25.3, 28.0, 31.1, 31.4, 36.5, 36.6, 36.9, 40.1, 40.2, 45.9, 46.1,

55.2, 55.2, 55.4, 66.1, 66.2, 82.5, 82.6, 98.6, 98.6, 103.7, 103.8, 103.9, 104.0, 105.2, 108.8,

108.9, 109.0, 109.2, 109.2, 109.4, 109.4, 117.6, 127.6, 128.2, 128.3, 133.1, 135.9, 135.8,

157.1, 157.5, 159.0, 160.4, 167.5, 170.6, 170.8, 173.4; Analiza elementarna obliczona dla

$C_{40}H_{56}FN_3O_8$: C, 66.19; H, 7.78; N, 5.79; zbadana: C, 65.97; H, 7.69; N, 5.79.



8.18.1. Synteza aldehydów z ugrupowaniem indolowym

Synteza związku 104. Do roztworu związku **103** (54.5 mg, 0.080

mmol) w acetonie (0.8 ml) dodano wodę (0.4 ml) i kwas *p*-

toluenosulfonowy (16 mg, 0.084 mmol). Mieszaninę reakcyjną

ogrzewano do temperatury 50 °C przez 40 minut, następnie

ochłodzono do temperatury pokojowej, dodano octan etylu (15 ml) i

przemityto nasyconym wodnym roztworem wodorowęglanu sodu (15

ml) i solanką (15 ml). Fazę organiczną wysuszono ($MgSO_4$). Rozpuszczalnik odparowano

pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej.

Wydajność 81%; 41 mg (0.065 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.25$ (heksan/EtOAc, 5:5,

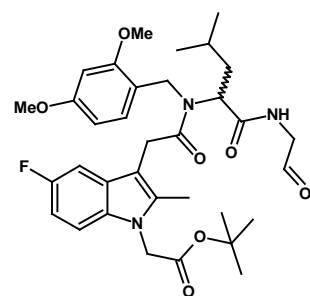
v/v); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.80-0.88 (m, 6H), 1.42 (s, 9H), 1.45-1.60 (m, 2H), 1.82-

1.95 (m, 1H), 2.24 (s, 3H), 3.65-3.82 (m, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.86-3.94 (m, 1H),

4.47 (dd, $J=17.5$, $J=48.1$, 2H), 4.64 (s, 2H), 4.87 (t, $J=6.7$ Hz, 1H), 6.45-6.51 (m, 2H), 6.86

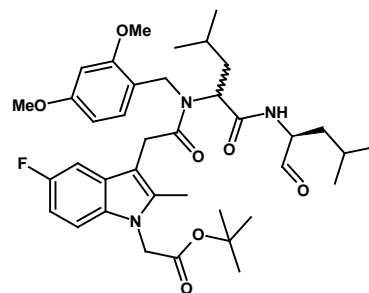
(dt, $J=2.5$ Hz, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.02-7.09 (m, 3H) 7.12 (dd, $J=2.3$ Hz, $J=9.8$ Hz, 1H), 9.37 (s,

1H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 10.3, 22.5, 22.6, 23.0, 25.1, 27.9, 29.7, 31.5, 36.4, 44.9,



45.8, 49.8, 55.2, 55.4, 56.6, 82.6, 98.6, 103.5, 103.8, 103.8, 105.2, 108.8, 108.9, 109.1, 109.4, 117.2, 128.2, 133.0, 135.9, 157.8, 160.5, 167.6, 171.8, 173.6, 197.0; HRMS-ESI: (m/z) obliczono dla $C_{34}H_{44}N_3O_7FNa$ $[M+MeOH+Na]^+$: 680.3323; zbadano: 680.3331.

Synteza związku 106. Do roztworu związku **105** (73 mg, 0.10 mmol) w metanolu (5 ml) dodano wodny roztwór wodorotlenku sodu (63 μ l, 0.25 mmol, 4 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Metanol odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w octanie etylu (10 ml) i dodano



roztwór kwasu solnego (10 ml, 1 M). Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano octanem etylu (2×10 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono ($MgSO_4$). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w dichlorometanie (4 ml) i dodano reagent Dess-Martina (84 mg, 0.20 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 45 minut. Dodano wodny roztwór wodorotlenku sodu (2 ml, 5%) i mieszano przez kolejne 15 minut. Mieszaninę rozcieńczono wodą (10 ml) i dichlorometanem (15 ml). Fazy rozdzielono, fazę wodną ekstrahowano dichlorometanem (3×20 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono ($MgSO_4$). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej. Wydajność 48%; 33 mg (0.048 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.30$ (heksan/EtOAc, 5:5, v/v); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.80-0.90 (m, 12H), 1.22-1.29 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.45-1.54 (m, 2H), 1.55-1.62 (m, 1H), 1.85-2.00 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 3.73-3.81 (m, 2H), 3.82-3.86 (m, 6H), 4.11-4.31 (m, 1H), 4.40 (t, $J=16.8$ Hz, 1H), 4.56-4.62 (m, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.72-4.94 (m, 1H), 6.49 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.8 (br s, 1H), 6.85 (dt, $J=2.5$ Hz, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.04 (dd, $J=4.2$ Hz, $J=8.8$ Hz), 7.06-7.11 (m, 1H), 7.12-7.15 (m, 1H), 9.12 (s, 0.5H, diast. I), 9.29 (s, 0.5H, diast. II); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 10.3, 10.3, 14.1, 21.6, 22.5, 22.7, 25.2, 27.9, 29.7, 31.3, 31.3, 36.2, 37.2, 37.2, 45.8, 45.9, 55.4, 56.9, 57.0, 82.6, 82.6, 98.6, 98.7, 103.9, 105.2, 108.8, 108.9, 117.2, 117.4, 128.0, 128.1, 128.3, 133.1, 135.9, 156.8, 157.7, 159.2, 160.5, 167.5, 171.6, 173.5, 173.6, 199.9, 200.0; Analiza elementarna obliczona dla $C_{38}H_{52}FN_3O_7$: C, 66.94; H, 7.69; N, 6.16; zbadana: C, 67.09; H, 8.00; N, 5.60.

8.19. Synteza peptoidów

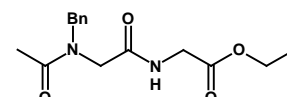
Procedura ogólna 11: Do roztworu aldehydu (1 eq.) w etanolu (4 ml / 1 mmol) dodano aminę (1 eq.) i mieszano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Dodano kwas

karboksylowy (1 eq.). Po kolejnych 15 minutach dodano izocyjanek (1 eq.). Mieszaninę reakcyjną mieszało w temperaturze pokojowej przez 7 dni, rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej z zastosowaniem gradientu układów rozpuszczalników (żel krzemionowy, 230-400 mesh, heksan/EtOAc).

8.19.1. Synteza peptoidów w reakcji Ugiiego z zastosowaniem różnych form formaldehydu

(((Acetylo(benzylo)amino)acetylo)amino)octan etylu (107a): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 11**.

Metoda A: Z zastosowaniem paraformaldehydu. Wydajność 77%;



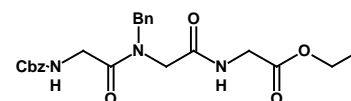
112 mg (0.38 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.19$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) dwa rotamery δ 1.20 (dt, $J=3.0$ Hz, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 2.14 (d, $J=5.8$ Hz, 3H, CH_3CO), 3.80-4.00 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2$), 4.12 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.59 (s, 2H, CH_2Ar), 6.87 (br s, 1H, NH), 7.00-7.35 (m, 5H, ArH); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) dwa rotamery δ 14.4, 21.6, 22.0, 41.5, 49.8, 50.0, 51.4, 53.4, 61.7, 126.9, 128.1, 128.2, 128.6, 129.0, 129.3, 135.9, 136.8, 168.8, 169.4, 169.9, 172.4; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4 + 0.3 \text{H}_2\text{O}$: C, 60.51; H, 6.97; N, 9.41; zbadana: C, 60.59; H, 7.07; N, 9.57.

Metoda B: Z zastosowaniem formaliny (37% wodny roztwór formaldehydu). Wydajność 22%; 32 mg (0.11 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.20$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Metoda C: Z zastosowaniem 1,3,5-trioksanu. Analiza składu mieszaniny reakcyjnej z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej nie wykazała obecności produktu.

(((Benzyloksykarbonylo(benzylo)amino)acetylo)amino)octan etylu (107b): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 11**.

Metoda A: Z zastosowaniem paraformaldehydu. Wydajność



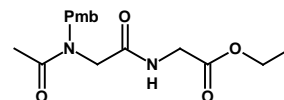
89%; 786 mg (1.78 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.27$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.27 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 3.97 (d, $J=5.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}$), 4.04 (s, 2H, NCH_2CO), 4.10-4.18 (m, 2H, NHCH_2CO), 4.19 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.62 (s, 2H, NCH_2Ph), 5.10 (s, 2H, OCH_2Ph), 5.80 (br s, 1H, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 6.70 (br s, 1H, NH), 7.12-7.30 (m, 5H, $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.34 (s, 5H, $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 14.5, 41.6, 43.0, 49.8, 50.6, 51.8, 61.9, 67.3, 127.1, 128.3, 128.5, 128.8, 129.5, 135.1, 136.6, 168.7, 169.5; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6 + 0.3 \text{H}_2\text{O}$: C, 61.82; H, 6.23; N, 9.40; zbadana: C, 61.86; H, 6.46; N, 9.32.

Metoda B: Z zastosowaniem formaliny (37% wodny roztwór formaldehydu). Wydajność 24%; 53 mg (0.12 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.27$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

Metoda C: Z zastosowaniem 1,3,5-trioksanu. Analiza składu mieszaniny reakcyjnej z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej nie wykazała obecności produktu.

(((Acetylo(4-metoksybenzylo)amino)acetylo)amino)octan etylu (107c): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 11**.

Metoda A: Z zastosowaniem paraformaldehydu. Wydajność 48%; 78 mg (0.24 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.39$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1, v/v); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) dwa rotamery δ 1.28 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 2.21 (d, $J=14.8$ Hz, 3H, CH_3CO), 3.80 (d, $J=3.0$ Hz, 3H, OCH_3), 3.88-4.05 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2$), 4.20 (dt, $J=3.2$ Hz, $J=7.1$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4.59 (s, 2H, CH_2Ar), 6.70 (br s, 1H, **NH**), 6.78-6.95 (m, 2H, **ArH**), 7.05-7.25 (m, 2H, **ArH**); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 14.5, 21.8, 41.5, 49.7, 53.0, 55.6, 61.8, 114.5, 114.7, 127.8, 128.4, 130.3, 159.6, 169.5, 172.3; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 59.62; H, 6.88; N, 8.69; zbadana: C, 59.52; H, 6.95; N, 8.55.

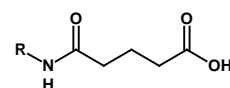


Metoda B: Z zastosowaniem formaliny. Wydajność 47%; 75 mg (0.23 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.38$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1, v/v); Dane spektroskopowe były zgodne z danymi dla produktu otrzymanego Metodą A.

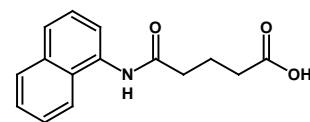
Metoda C: Z zastosowaniem 1,3,5-trioksanu. Analiza składu mieszaniny reakcyjnej z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej nie wykazała obecności produktu.

8.19.2. Synteza kwasów glutaramowych 110a-110h

Procedura ogólna 12: Do schłodzonego do temperatury 10 °C roztworu bezwodnika glutarowego (570.5 mg, 5.0 mmol) w dichlorometanie (50 ml) dodano aminę (5.0 mmol). Mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez 3 dni. Produkt krystalizujący z mieszaniny reakcyjnej odsączono.

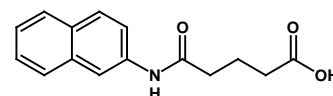


Kwas 5-(1-naftyloamino)-5-oksopenatanowy (110a): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 12**. Wydajność 82%; 1.046 g (4.10 mmol) białych kryształów; $R_f = 0.14$ (heksan/EtOAc, 2:8, v/v); t.t. 168-171 °C; $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 1.88 (qu, $J=7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.33 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2COOH), 2.52 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, CH_2CONH), 3.36 (br s, 1H, **NH**), 7.40-7.60 (m, 3H, **ArH**), 7.67 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, **ArH**), 7.75 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, **ArH**), 7.87-7.98 (m, 1H, **ArH**), 7.95-8.10 (m, 1H, **ArH**), 9.89 (s, 1H, **OH**); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 20.7, 33.1, 35.0, 121.7, 122.7, 125.1, 125.5, 125.7, 125.9, 128.0, 133.6,



133.6, 171.4, 174.1; Analiza elementarna obliczona dla $C_{15}H_{15}NO_3 + 0.2 H_2O$: C, 69.06; H, 5.95; N, 5.37; zbadana: C, 69.09; H, 5.89; N, 5.26.

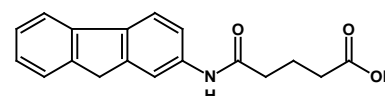
Kwas 5-(2-naftyloamino)-5-oksopentatanowy (110b): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 12**. Wydajność 87%;



1.12 g (4.35 mmol) białych kryształów; $R_f = 0.16$

(heksan/EtOAc, 2:8, v/v); t.t. 168-174 °C; 1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO,) δ 1.83 (qu, $J=7.2$ Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 2.30 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, CH_2COOH), 2.41 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2CONH), 3.42 (br s, 1H, NH), 7.30-7.50 (m, 2H, ArH), 7.56 (dd, $J=2.1$ Hz, $J=8.9$ Hz, 1H, ArH), 7.72-7.88 (m, 3H, ArH), 8.29 (s, 1H, ArH), 10.10 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 20.5, 33.0, 35.5, 115.0, 120.0, 124.5, 126.4, 127.2, 127.4, 128.2, 129.6, 133.4, 136.8, 171.0, 174.2; Analiza elementarna obliczona dla $C_{15}H_{15}NO_3 + 0.5 H_2O$: C, 67.66; H, 6.06; N, 5.26; zbadana: C, 67.80; H, 5.97; N, 5.02.

Kwas 5-(2-fluorenyloamino)-5-oksopentatanowy (110c):

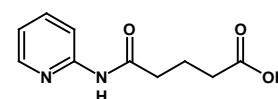


Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 12**.

Wydajność 80%; 1.171 g (4.00 mmol) białych kryształów; R_f

= 0.05 (heksan/EtOAc, 2:8, v/v); t.t. 201-203 °C; 1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 1.82 (qu, $J=7.2$ Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 2.28 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2COOH), 2.37 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CONH), 3.33 (br s, 1H, NH), 3.87 (s, 2H, Ar CH_2 Ar), 7.08-7.45 (m, 2H, ArH), 7.52 (d, $J=7.6$ Hz, 2H, ArH), 7.78 (d, $J=8.2$ Hz, 2H, ArH), 7.93 (s, 1H, ArH), 9.97 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 20.5, 33.0, 35.5, 36.5, 115.9, 117.8, 119.3, 120.0, 124.9, 126.0, 126.6, 136.0, 138.3, 141.0, 142.7, 143.6, 170.6, 174.1; Analiza elementarna obliczona dla $C_{18}H_{17}NO_3 + 0.5 H_2O$: C, 71.04; H, 5.96; N, 4.60; zbadana: C, 71.10; H, 5.76; N, 4.48.

Kwas 5-okso-5-(2-pirydynyloamino)pentanowy (110d): Produkt

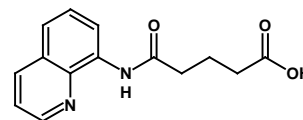


otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 12**. Po 3 dniach z mieszaniny reakcyjnej rozpuszczalnik odparowano pod

zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w tetrahydrofuranie (15 ml), produkt wytrącano heksanem. Wydajność 57%; 0.562 g (2.84 mmol) białych kryształów; $R_f = 0.63$ ($CHCl_3/MeOH/NH_{4aq.}$, 10:2:0.25, v/v/v); t.t. 188-191 °C; 1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 1.78 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 2.25 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2COOH), 2.41 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, CH_2CONH), 3.33 (br s, 1H, NH), 7.06 (t, $J=5.7$ Hz, 1H, ArH), 7.74 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 8.07 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, ArH), 8.27 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, ArH), 10.04 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 20.2, 32.9, 35.1, 113.4, 119.1, 138.0, 147.8, 152.0, 171.6,

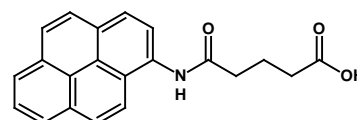
174.0; Analiza elementarna obliczona dla $C_{10}H_{12}N_2O_3$: C, 57.68; H, 5.81; N, 13.45; zbadana: C, 57.60; H, 5.75; N, 13.20.

Kwas 5-okso-5-(8-chinolinylamino)pentanowy (110e): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 12**. Po 3 dniach z mieszaniny reakcyjnej rozpuszczalnik odparowano pod

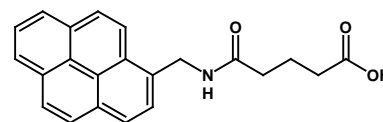


zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w tetrahydrofuranie, dodano heksan (15 ml) i schłodzono. Wytrącony osad produktu odsączono. Wydajność 68%; 0.874 g (3.38 mmol) żółtych kryształów; $R_f = 0.14$ (heksan/EtOAc, 2:8, v/v); t.t. 98-102 °C; 1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 1.87 (dt, $J=7.0$ Hz, $J=7.0$ Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 2.31 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, CH_2COOH), 2.60 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, CH_2CONH), 3.32 (br s, 1H, NH), 7.50-7.76 (m, 3H, ArH), 8.24-8.48 (m, 1H, ArH), 8.56-8.68 (m, 1H, ArH), 8.86-8.98 (m, 1H, ArH), 10.04 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 20.6, 32.9, 35.8, 116.5, 121.7, 122.0, 126.9, 127.7, 134.4, 136.5, 148.7, 171.1, 174.0; Analiza elementarna obliczona dla $C_{14}H_{14}N_2O_3$: C, 65.11; H, 5.46; N, 10.85; zbadana: C, 64.83; H, 5.47; N, 10.64.

Kwas 5-(1-pirenylamino)-5-oksopentanowy (110f): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 12**. Reakcję prowadzono z 1 mmol 1-aminopirenu. Wydajność 64%; 0.213 g (0.64 mmol) jasnozielonych kryształów; $R_f = 0.05$ (heksan/EtOAc, 2:8, v/v); t.t. 233-237 °C; 1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 1.96 (qu, $J=7.2$ Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 2.40 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2COOH), 2.63 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CONH), 3.10-3.90 (br s, 1H, NH), 8.00-8.40 (m, 9H, ArH), 10.31 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 20.7, 33.2, 35.0, 122.3, 123.4, 123.9, 124.3, 124.8, 124.9, 125.1, 126.3, 126.5, 127.0, 127.2, 128.1, 130.4, 130.8, 131.9, 171.6, 174.2; Analiza elementarna obliczona dla $C_{21}H_{17}NO_3 + 0.7 H_2O$: C, 73.33; H, 5.39; N, 4.07; zbadana: C, 73.51; H, 8.25; N, 4.10.



Kwas 5-((1-pirenylometylo)amino)-5-oksopentanowy (110g): Do schłodzonego do temperatury 10 °C roztworu bezwodnika glutarowego (114.1 mg, 1.0 mmol) w

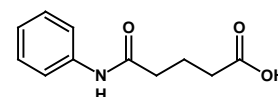


dichlorometanie (10 ml) dodano trietyloaminę (145 μ l, 1.05 mmol) i chlorowodorek 1-(1-pirenylo)metanoaminy (217.3 mg, 1.00 mmol). Mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez 3 dni po czym rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wytrącano z układu EtOAc/heksan. Produkt był zanieczyszczony trietyloaminą. Wydajność 67%; 0.232 g (0.67 mmol) białych kryształów; $R_f = 0.59$ ($CHCl_3/MeOH$, 8:2, v/v); 1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 1.77 (qu, $J=7.2$ Hz, 2H,

CH₂CH₂CH₂), 2.16-2.30 (m, 4H, CH₂CONH + CH₂COOH), 5.00 (d, *J*=5.6 Hz, 2H, CH₂Ar), 8.04 (q, *J*=7.5 Hz, 2H, ArH), 8.15 (s, 2H, ArH), 8.19-8.40 (m, 5H, ArH), 8.54 (t, *J*=5.6 Hz, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, d₆-DMSO) δ 20.8, 22.8, 33.2, 34.5, 123.2, 124.6, 125.2, 126.2, 126.6, 126.9, 127.3, 127.4, 130.3, 130.7, 171.5, 177.2; Et₃N ¹H NMR (200 MHz, d₆-DMSO) δ 0.94 (t, *J*=7.2 Hz, 9H, CH₃), 2.49 (q, *J*=7.0 Hz, 6H, CH₂); ¹³C NMR (50 MHz, d₆-DMSO) δ 11.3, 45.6; Analiza elementarna obliczona dla C₂₂H₁₉NO₃ + 0.4 Et₃N + 0.2 H₂O: C, 75.23; H, 6.58; N, 5.04; zbadana: C, 75.30; H, 6.77; N, 5.05.

Kwas 5-anilino-5-oksopentanowy (110h): Produkt otrzymano

zgodnie z **Procedurą ogólną 12**. Wydajność 81%; 0.839 mg (4.05 mmol) białych kryształów; R_f = 0.07 (heksan/EtOAc, 2:8, v/v); t.t.

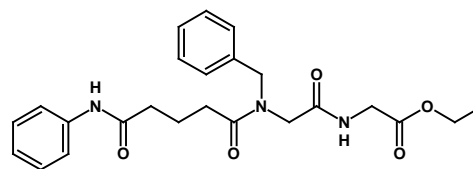


126-128 °C (lit.²⁰⁰ 126-127); ¹H NMR (200 MHz, d₆-DMSO) δ 1.79 (qu, *J*=7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.26 (t, *J*=7.3 Hz, 2H, CH₂COOH), 2.34 (t, *J*=7.4 Hz, 2H, CH₂CONH), 3.35 (br s, 1H, NH), 7.00 (t, *J*=7.3 Hz, 1H, ArH), 7.27 (t, *J*=7.8 Hz, 2H, ArH), 7.57 (d, *J*=7.8 Hz, 2H, ArH), 9.87 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, d₆-DMSO) δ 20.4, 33.0, 35.4, 119.0, 122.9, 128.6, 139.2, 170.6, 174.1; Analiza elementarna obliczona dla C₁₁H₁₃NO₃: C, 63.73; H, 6.32; N, 6.76; zbadana: C, 63.51; H, 6.38; N, 6.69.

8.19.3. Synteza peptoidów w reakcji Ugiego z zastosowaniem kwasów glutaramowych

Związek 111a. Związek otrzymano zgodnie z

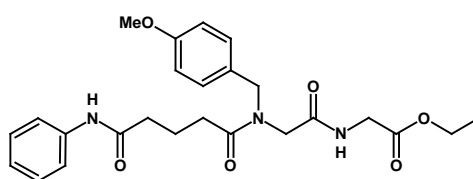
Procedurą ogólną 11 z zastosowaniem paraformaldehydu. Wydajność 72%; 158 mg (0.36 mmol) bezbarwnego oleju; R_f = 0.42 (CHCl₃/MeOH,



9:1, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.28 (t, *J*=7.1 Hz, 3H), 2.14 (qu, *J*=6.3 Hz, 2H), 2.46 (t, *J*=6.7 Hz, 2H), 2.57 (t, *J*=6.3 Hz, 2H), 3.88-4.03 (m, 2H), 4.05 (s, 2H), 4.21 (q, *J*=7.0 Hz, 2H), 4.61 (s, 2H), 6.98-7.16 (m, 3H), 7.20-4.38 (m, 6H), 7.55 (t, *J*=8.6 Hz, 2H), 8.57 (s, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.5, 21.7, 31.2, 36.2, 41.5, 50.3, 53.1, 62.0, 120.1, 124.3, 126.9, 128.3, 128.7, 129.2, 129.3, 135.9, 138.7, 169.6, 170.5, 171.7, 174.6; Analiza elementarna obliczona dla C₂₄H₂₉N₃O₅ + 0.5 H₂O: C, 64.27; H, 6.74; N, 9.37; zbadana: C, 64.37; H, 6.92; N, 9.06.

Związek 111b. Związek otrzymano zgodnie z

Procedurą ogólną 11 z zastosowaniem paraformaldehydu. Wydajność 65%; 62 mg (0.13 mmol) bezbarwnego oleju; R_f = 0.32 (CHCl₃/MeOH,

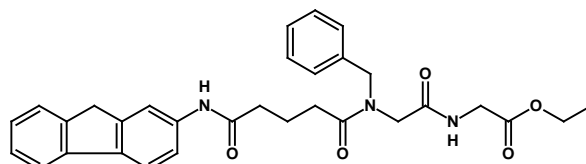


9:1, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.28 (t, *J*=7.2 Hz, 3H), 2.14 (t, *J*=6.2 Hz, 2H), 2.47

(t, $J=6.5$ Hz, 2H), 2.59 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.93 (br s, 1H), 3.99 (s, 1H), 4.02 (s, 2H), 4.15 (t, $J=3.6$ Hz, 1H), 4.22 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.53 (s, 2H), 6.74-6.88 (m, 2H), 6.96-7.20 (m, 3H), 7.22-7.38 (m, 2H), 7.46-7.64 (m, 2H), 8.58 (s, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 14.5, 21.7, 31.3, 36.2, 41.5, 50.0, 52.6, 55.6, 62.0, 97.3, 114.4, 114.7, 120.1, 124.3, 127.8, 128.4, 129.2, 130.2, 138.7, 159.6, 169.7, 170.5, 171.7, 174.4; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6 + 0.3 \text{H}_2\text{O}$: C, 63.22; H, 6.71; N, 8.85; zbadana: C, 63.35; H, 6.83; N, 8.78.

Związek 111c. Związek otrzymano zgodnie z

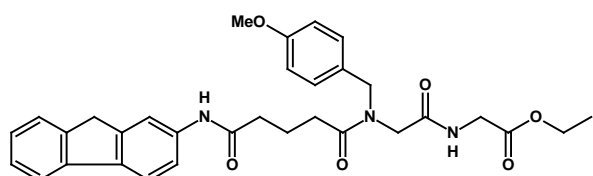
Procedurą ogólną 11 z zastosowaniem paraformaldehydu. Wydajność 70%; 182 mg (0.35 mmol) białych kryształów; t.t. 148-151



$^{\circ}\text{C}$; $R_f = 0.38$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1, v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.28 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 2.18 (qu, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.50 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 2.59 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.90-4.04 (m, 2H), 4.06 (s, 2H), 4.21 (q, $J=7.0$ Hz, 2H), 4.62 (s, 2H), 6.94-7.16 (m, 3H), 7.20-7.34 (m, 4H), 7.35-7.46 (m, 2H), 7.47-7.56 (m, 1H), 7.60-7.76 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 8.68 (s, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 14.5, 21.8, 31.2, 36.3, 37.4, 41.6, 50.4, 53.2, 62.1, 117.0, 118.8, 119.8, 120.3, 125.3, 126.5, 126.9, 127.1, 128.3, 128.7, 129.3, 135.9, 137.6, 143.5, 144.5, 169.6, 170.5, 171.6, 174.6; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$: C, 70.57; H, 6.30; N, 7.96; zbadana: C, 70.38; H, 6.43; N, 7.93.

Związek 111d. Związek otrzymano zgodnie

z **Procedurą ogólną 11** z zastosowaniem paraformaldehydu. Wydajność 70%; 78 mg (0.14 mmol) białych kryształów; t.t. 93-96



$^{\circ}\text{C}$; $R_f = 0.36$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1, v/v); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.28 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 2.17 (t, $J=6.2$ Hz, 2H), 2.50 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 2.61 (t, $J=6.2$ Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.74-3.80 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.90-3.96 (m, 1H), 4.03 (s, 2H), 4.08-4.12 (m, 1H), 4.21 (q, $J=7.2$ Hz), 4.54 (s, 2H), 6.80 (t, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.10-7.32 (m, 2H), 7.33-7.56 (m, 2H), 7.60-7.76 (m, 2H), 7.95 (s, 1H), 8.69 (s, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 14.5, 21.8, 31.3, 36.3, 37.4, 41.6, 50.1, 52.7, 55.5, 62.0, 114.7, 117.0, 118.8, 119.7, 120.3, 125.3, 126.5, 127.0, 127.7, 128.4, 130.2, 137.6, 143.4, 144.5, 159.6, 169.7, 170.5, 171.7, 174.4; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6 + 0.7 \text{H}_2\text{O}$: C, 67.40; H, 6.43; N, 7.37; zbadana: C, 67.42; H, 6.56; N, 7.43.

8.19.4. Synteza pentapeptoidów 115a-i z zastosowaniem reakcji Ugiego

Reakcja Ugiego

Procedura ogólna 13. Do roztworu aminy (1 eq.) w etanolu dodano paraformaldehyd (1 eq.) w temperaturze pokojowej. Po 15 minutach dodano kwas karboksylowy (1 eq.). Po kolejnych 15 minutach dodano izocyjanek (1 eq.). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono za pomocą chromatografii kolumnowej.

Hydroliza grupy estrowej w produktach reakcji Ugiego.

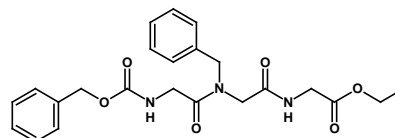
Procedura ogólna 14. Do roztworu produktu reakcji Ugiego (1 eq.) w metanolu (5 ml) dodano wodny roztwór wodorotlenku sodu (2.5 eq., 4 M). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano kwasu solny (10 ml, 1 M) i ekstrahowano octanem etylu (3 × 15 ml). Fazy organiczne połączono i wysuszono (MgSO₄). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt użyto do kolejnej reakcji bez dalszego oczyszczenia.

Cbz-Gly-N(Bn)-Gly-Gly-OEt (113a): Produkt otrzymano

zgodnie z **Procedurą ogólną 13**. Czas reakcji: 7 dni.

Wydajność 89%; 786 mg (1.78 mmol) bezbarwnego oleju;

$R_f = 0.27$ (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.27 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.97 (d, $J=5.4$ Hz, 2H, CH₂C(O)O), 4.04 (s, 2H, NCH₂CO), 4.10-4.18 (m, 2H, NHCH₂CO), 4.19 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.62 (s, 2H, NCH₂Ph), 5.10 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.80 (br s, 1H, NHC(O)O), 6.70 (br s, 1H, NH), 7.12-7.30 (m, 5H, NCH₂C₆H₅), 7.34 (s, 5H, OCH₂C₆H₅); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.5, 41.6, 43.0, 49.8, 50.6, 51.8, 61.9, 67.3, 127.1, 128.3, 128.5, 128.8, 129.5, 135.1, 136.6, 168.7, 169.5; Analiza elementarna obliczona dla C₂₃H₂₇N₃O₆ + 0.3 H₂O: C, 61.82; H, 6.23; N, 9.40; zbadana: C, 61.86; H, 6.46; N, 9.32.

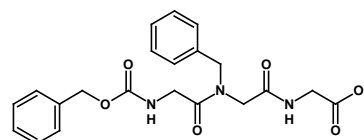


Cbz-Gly-N(Bn)-Gly-Gly-OH (114a): Produkt otrzymano

zgodnie z **Procedurą ogólną 14**. Wydajność 95%; 663 mg

(1.60 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.04$ (CHCl₃/MeOH,

95:5, v/v).



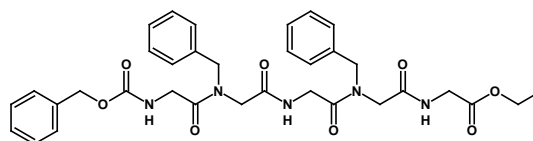
Cbz-Gly-N(Bn)-Gly-Gly-N(Bn)-Gly-Gly-OEt (115a): Produkt otrzymano zgodnie z

Procedurą ogólną 13. Czas reakcji: 4 dni.

Wydajność 71%; 111 mg (0.17 mmol)

bezbarwnego oleju; $R_f = 0.46$ (CHCl₃/MeOH, 9:1,

v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.31 (dt, $J=2.2$ Hz, $J=7.6$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.88-4.00

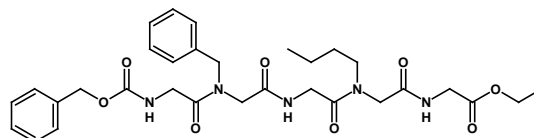


(m, 4H, NHCH₂CO), 4.00-4.24 (m, 8H, NCH₂CO + OCH₂CH₃), 4.52-4.65 (m, 4H, NCH₂Ph), 5.08 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.90 (br s, 1H, NHC(O)O), 6.95 (br s, 1H, NH), 7.14 (br s, 1H, NH), 7.15-7.28 (m, 10H, NCH₂C₆H₅), 7.32 (s, 5H, OCH₂C₆H₅); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.4, 41.5, 43.0, 49.5, 50.5, 51.7, 61.7, 67.2, 127.1, 128.1, 128.3, 128.3, 128.7, 129.0, 129.3, 135.2, 135.6, 136.6, 156.7, 168.3, 168.8, 169.5, 170.0, 170.2; Analiza elementarna obliczona dla C₃₄H₃₉N₅O₈ + 1.2 H₂O: C, 61.20; H, 6.25; N, 10.49; zbadana: C, 61.15; H, 6.48; N, 10.15.

Cbz-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-OEt (115b): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 13**. Czas reakcji: 4 dni.

Wydajność 42%; 65 mg (0.10 mmol)

bezbarwnego oleju; R_f = 0.45 (CHCl₃/MeOH, 9:1,

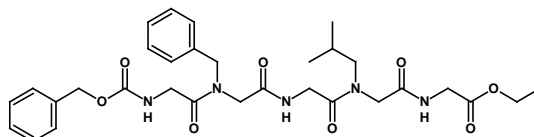


v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.93 (t, J=7.0 Hz, 3H, CH₂CH₂CH₃), 1.24 (t, J=7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.20-1.39 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.42-1.66 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.31 (t, J=7.6 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 3.90-4.00 (m, 4H, NHCH₂CO), 4.04 (s, 4H, NCH₂CO), 4.05-4.14 (m, 2H, NHCH₂CO), 4.14 (q, J=7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4.61 (s, 2H, NHCH₂Ph), 5.09 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.94 (br s, 1H, NHC(O)O), 7.08 (br s, 1H, NH), 7.14 (br s, 1H, NH), 7.15-7.25 (m, 5H, NHCH₂C₆H₅), 7.33 (s, 5H, OCH₂C₆H₅); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.1, 14.4, 20.3, 30.6, 41.5, 43.0, 48.8, 50.3, 51.8, 61.8, 67.2, 127.1, 128.3, 128.4, 128.8, 129.4, 135.2, 156.7, 169.1, 169.3, 170.1; Analiza elementarna obliczona dla C₃₁H₄₁N₅O₈ + 1.0 H₂O: C, 59.13; H, 7.17; N, 11.12; zbadana: C, 59.14; H, 7.18; N, 10.94.

Cbz-Gly-N(Bn)-Gly-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-OEt (115c): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 13**. Czas reakcji: 4 dni.

Wydajność 67%; 97 mg (0.16 mmol)

bezbarwnego oleju; R_f = 0.42 (CHCl₃/MeOH,

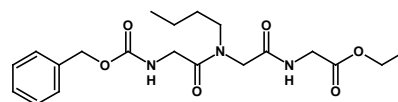


95:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.80-1.00 (m, 6H, CH(CH₃)), 1.23 (t, J=7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.84-2.06 (m, 1H, NCH₂CH), 3.15 (d, J=7.1 Hz, 2H, NCH₂Ph), 3.80-4.00 (m, 4H, NHCH₂CO), 4.02-4.10 (m, 4H, NCH₂CO), 4.12-4.40 (m, 2H, NHCH₂CO), 4.13 (q, J=7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4.61 (s, 2H, NHCH₂Ph), 5.08 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.95 (br s, 1H, NHC(O)O), 7.11 (br s, 1H, NH), 7.14 (br s, 1H, NH), 7.15-7.30 (m, 5H, NHCH₂C₆H₅), 7.33 (s, 5H, OCH₂C₆H₅); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.4, 20.2, 27.6, 41.5, 43.0, 49.5, 50.6, 51.7, 56.1, 61.7, 67.2, 127.1, 128.3, 128.4, 128.8, 129.0, 129.4, 135.2, 136.7, 156.7, 168.7, 169.0, 169.3, 169.8, 170.1; Analiza elementarna obliczona dla C₃₁H₄₁N₅O₈ + 1.0 H₂O: C, 59.13; H, 6.88; N, 11.12; zbadana: C, 59.11; H, 7.03; N, 10.99.

Cbz-Gly-N(Buⁿ)-Gly-Gly-OEt (113b): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 13**.

Czas reakcji: 2 dni. Wydajność 87%; 708 mg (1.74 mmol)

bezbarnego oleju; $R_f = 0.41$ (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H

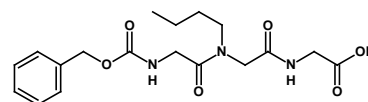


NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.94 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH₂CH₂CH₃), 1.27 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.30-1.40 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1.46-1.66 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 3.22-3.40 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.98 (d, $J=5.6$ Hz, 2H, CH₂C(O)O), 4.04 (s, 2H, NCH₂CO), 4.10 (d, $J=4.4$ Hz, 2H, NHCH₂CO), 4.19 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.12 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.78 (br s, 1H, NHC(O)O), 6.80 (br s, 1H, NH), 7.35 (s, 5H, ArH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.1, 14.5, 0.3, 30.7, 41.5, 42.8, 48.9, 50.7, 61.8, 67.3, 128.3, 128.4, 128.8, 136.7, 169.1, 169.5; Analiza elementarna obliczona dla C₂₀H₂₉N₃O₆ + 0.8 H₂O: C, 56.94; H, 7.31; N, 9.96; zbadana: C, 56.91; H, 7.03; N, 9.69.

Cbz-Gly-N(Buⁿ)-Gly-Gly-OH (114b): Produkt otrzymano

zgodnie z **Procedurą ogólną 14**. Wydajność 91%; 516 mg

(1.36 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.05$ (CHCl₃/MeOH,



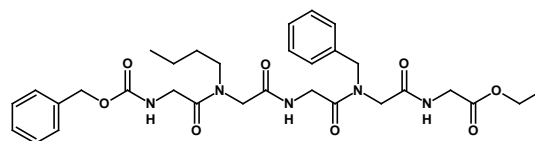
95:5, v/v).

Cbz-Gly-N(Buⁿ)-Gly-Gly-N(Bn)-Gly-Gly-OEt (115d): Produkt otrzymano zgodnie z

Procedurą ogólną 13. Czas reakcji: 2 dni.

Wydajność 73%; 115 mg (0.19 mmol)

bezbarnego oleju; $R_f = 0.41$ (CHCl₃/MeOH,

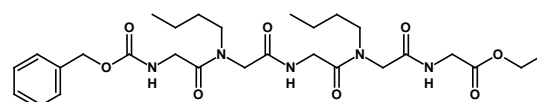


95:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.93 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₂CH₂CH₃), 1.26 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.24-1.40 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.42-1.66 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.20-3.46 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.86-4.00 (m, 4H, NHCH₂CO), 4.05 (s, 4H, NCH₂CO), 4.06-4.12 (m, 2H, NHCH₂CO), 4.17 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4.61 (s, 2H, NHCH₂Ph), 5.10 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.88 (br s, 1H, NHC(O)O), 6.88 (br s, 1H, NH), 7.14 (br s, 1H, NH), 7.15-7.30 (m, 5H, NHCH₂C₆H₅), 7.34 (s, 5H, OCH₂C₆H₅); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.1, 14.5, 20.3, 30.7, 41.5, 42.8, 50.3, 51.8, 61.9, 67.3, 127.1, 128.3, 128.8, 129.5, 168.7, 169.4, 169.8; Analiza elementarna obliczona dla C₃₁H₄₁N₅O₈ + 1.0 H₂O: C, 59.13; H, 7.17; N, 11.12; zbadana: C, 59.07; H, 7.13; N, 11.06.

Cbz-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-OEt (115e): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 13**. Czas reakcji: 2 dni.

Wydajność 83%; 124 mg (0.21 mmol)

bezbarnego oleju; $R_f = 0.41$ (CHCl₃/MeOH, 9:1,

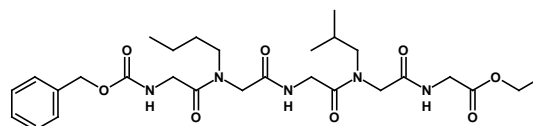


v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.93 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH₂CH₂CH₃), 0.94 (t, $J=7.0$ Hz,

3H, CH₂CH₂CH₃), 1.26 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.24-1.40 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1.42-1.66 (m, 4H, NCH₂CH₂), 3.31 (t, *J*=7.6 Hz, 4H, NCH₂CH₂), 3.92-4.02 (m, 4H, NHCH₂CO), 4.04 (s, 2H, NCH₂CO), 4.05 (s, 2H, NCH₂CO), 4.06-4.14 (m, 2H, NHCH₂C(O)O), 4.17 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.12 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.88 (br s, 1H, NHC(O)O), 6.92 (br s, 1H, NH), 7.14 (br s, 1H, NH), 7.35 (s, 5H, ArH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.1, 14.5, 20.3, 30.7, 41.5, 42.8, 48.8, 50.3, 61.8, 67.3, 128.3, 128.8, 168.8, 169.4; Analiza elementarna obliczona dla C₂₈H₄₃N₅O₈ + 1.0 H₂O: C, 56.46; H, 7.61; N, 11.76; zbadana: C, 56.34; H, 7.90; N, 11.39.

Cbz-Gly-N(Buⁱⁱ)-Gly-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-Et (115f): Produkt otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 13. Czas reakcji: 2 dni.

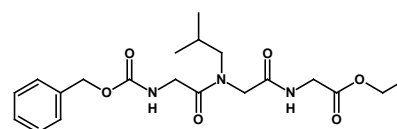
Wydajność 65%; 98 mg (0.17 mmol) bezbarwnego oleju; R_f = 0.41 (CHCl₃/MeOH,



95:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.86-1.30 (m, 9H, CH(CH₃)₂+(CH₂)₂CH₃), 1.32 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.30-1.48 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.50-1.74 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1.94-2.10 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.22 (d, *J*=7.6 Hz, 2H, NCH₂CH), 3.26-3.54 (m, 2H, NCH₂CH₂), 4.00-4.09 (m, 4H, NHCH₂C(O)O), 4.11 (s, 4H, NCH₂CO), 4.10-4.24 (m, 2H, CH₂NHC(O)O), 4.24 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.18 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.94 (br s, 1H, NHC(O)O), 7.02 (br s, 1H, NHCH₂C(O)O), 7.22 (br s, 1H, NH), 7.41 (s, 5H, ArH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.1, 14.5, 20.2, 27.7, 30.7, 41.6, 42.8, 48.7, 50.1, 50.8, 56.2, 61.8, 67.3, 128.3, 128.8, 130.4, 156.6, 168.9, 169.4; Analiza elementarna obliczona dla C₂₈H₄₃N₅O₈ + 1.0 H₂O: C, 56.46; H, 7.61; N, 11.76; zbadana: C, 56.32; H, 7.83; N, 11.54.

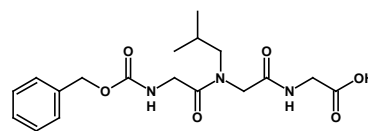
Cbz-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-OEt (113c): Produkt otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 13. Czas reakcji: 4 dni.

Wydajność 82%; 665 mg (1.63 mmol) bezbarwnego oleju;



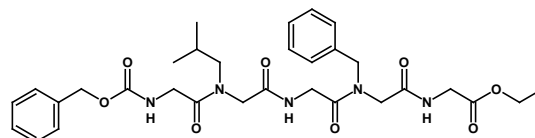
R_f = 0.26 (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (d, *J*=7.0 Hz, 3H, CHCH₃), 0.94 (d, *J*=7.0 Hz, 3H, CHCH₃), 1.27 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.88-2.10 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.15 (d, *J*=7.6 Hz, 2H, NCH₂CH), 3.98 (d, *J*=5.4 Hz, 2H, NHCH₂CO), 4.05 (s, 2H, NCH₂CO), 4.10 (d, *J*=4.6 Hz, 2H, NHCH₂CO), 4.19 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 5.12 (s, 2H, CH₂Ph), 5.78 (br s, 1H, NHC(O)O), 6.85 (br s, 1H, NH), 7.35 (s, 5H, ArH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.5, 20.2, 27.7, 41.6, 43.0, 51.1, 56.3, 61.8, 67.3, 128.3, 128.5, 128.8, 169.1, 170.0; Analiza elementarna obliczona dla C₂₀H₂₉N₃O₆ + 0.3 H₂O: C, 58.18; H, 7.23; N, 10.18; zbadana: C, 58.20; H, 7.62; N, 10.08.

Cbz-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-OH (114c): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 14**. Wydajność 77%; 357 mg (0.94 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.05$ (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v).



Cbz-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-N(Bn)-Gly-Gly-OEt (115g): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 13**. Czas reakcji: 2 dni.

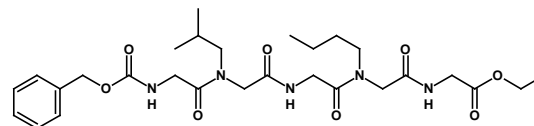
Wydajność 87%; 138 mg (0.23 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.34$ (CHCl₃/MeOH, 9:1,



v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.87 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, CHCH₃), 0.93 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, CHCH₃), 1.25 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.80-2.06 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.14 (d, $J=7.4$ Hz, 2H, NCH₂CH), 3.86-4.00 (m, 4H, NHCH₂C(O)), 4.05 (s, 4H, NCH₂CO), 4.07-4.12 (m, 2H, NHCH₂CO), 4.16 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.61 (s, 2H, NCH₂Ph), 5.10 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.90 (br s, 1H, NHC(O)O), 6.93 (br s, 1H, NH), 7.18 (br s, 1H, NH), 7.10-7.26 (m, 5H, ArH), 7.33 (s, 5H, ArH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 11.7, 14.5, 20.3, 27.7, 41.7, 49.7, 56.1, 61.8, 67.2, 127.1, 128.3, 128.8, 129.5, 168.9, 169.9; Analiza elementarna obliczona dla C₃₁H₄₁N₅O₈ + 0.1 H₂O: C, 60.69; H, 6.77; N, 11.42; zbadana: C, 60.54; H, 7.00; N, 11.42.

Cbz-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-N(Buⁿ)-Gly-Gly-OEt (115h): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 1**. Czas reakcji: 2 dni.

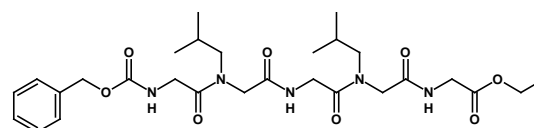
Wydajność 75%; 112 mg (0.19 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.41$ (CHCl₃/MeOH, 9:1,



v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.80-1.00 (m, 9H, CH(CH₃)₂+(CH₂)₂CH₃), 1.25 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.30-1.40 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.46-1.64 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.80-2.06 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.15 (d, $J=7.6$ Hz, 2H, NCH₂CH), 3.20-3.40 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.92-4.14 (m, 10H, NCH₂CO+NHCH₂CO), 4.17 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.11 (s, 2H, OCH₂Ph); 5.89 (br s, 1H, NHC(O)O), 6.95 (br s, 1H, NH), 7.17 (br s, 1H, NH), 7.35 (s, 5H, ArH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.1, 14.5, 20.3, 27.8, 30.7, 41.5, 43.0, 48.8, 50.5, 56.1, 61.8, 67.2, 128.3, 128.8, 168.9, 169.1, 169.3, 169.8; HRMS-ESI: (m/z) obliczone dla C₂₈H₄₃N₅O₈Na [M+Na]⁺: 600.3004; zbadane: 600.2977.

Cbz-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-N(Buⁱ)-Gly-Gly-OEt (115i): Produkt otrzymano zgodnie z **Procedurą ogólną 1**. Czas reakcji: 2 dni.

Wydajność 75%; 112 mg (0.19 mmol) bezbarwnego oleju; $R_f = 0.49$ (CHCl₃/MeOH, 9:1,

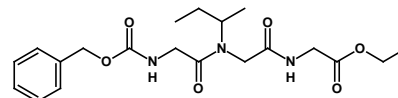


v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.80-1.20 (m, 12H, CH(CH₃)), 1.25 (t, $J=7.1$ Hz,

CH₂CH₃), 1.80-2.06 (m, (2H, CH(CH₃)), 3.15 (d, *J*=7.6 Hz, 4H, NCH₂CH), 3.90-4.03 (m, 4H, NHCH₂CO), 4.05 (s, 4H, NCH₂CO), 4.07-4.12 (m, 2H, NHCH₂CO), 4.17 (q, *J*=7.0 Hz, 2H, CH₂CH₃), 5.11 (s, 2H, CH₂Ph), 5.88 (br s, 1H, NHC(O)O), 6.97 (br s, 1H, NH), 7.18 (br s, 1H, NH), 7.34 (s, 5H, ArH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.5, 20.3, 27.7, 41.6, 43.0, 50.6, 56.2, 61.8, 67.2, 128.3, 128.8, 168.8, 169.7; Analiza elementarna obliczona dla C₂₈H₄₃N₅O₈ + 0.8 H₂O: C, 56.80; H, 7.59; N, 11.83; zbadana: C, 56.91; H, 7.85; N, 11.46.

Cbz-Gly-N(Bu^s)-Gly-Gly-Et (113d): Produkt otrzymano

zgodnie z **Procedurą ogólną 13**. Czas reakcji: 2 dni.

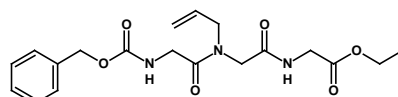


Wydajność 62%; 251 mg (0.62 mmol) bezbarwnego oleju;

R_f = 0.44 (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, *J*=7.3 Hz, 3H, CHCH₂CH₃), 1.24 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, OCHCH₃), 1.26 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 1.48-1.70 (m, 2H, CHCH₂), 3.67 (sekszet, *J*=6.9 Hz, 1H, NCH), 3.76-3.91 (m, 2H, NHCH₂CO), 3.92-4.02 (m, 2H, CH₂NC(O)O), 4.03-4.13 (m, 2H, NHCH₂CO), 4.18 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.13 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.85 (br s, 1H, NHC(O)O), 7.01 (br s, 1H, NH), 7.36 (s, 5H, ArH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 11.4, 14.4, 19.2, 27.9, 41.6, 43.3, 45.6, 54.8, 61.8, 67.3, 128.3, 128.4, 128.8, 136.6, 156.5, 169.7, 169.8, 169.9; Analiza elementarna obliczona dla C₂₀H₂₉N₃O₆: C, 58.95; H, 7.17; N, 10.31; zbadana: C, 58.76; H, 7.30; N, 10.14.

Cbz-Gly-N(All)-Gly-Gly-OEt (113e): Produkt otrzymano

zgodnie z **Procedurą ogólną 13**. Czas reakcji: 4 dni.



Wydajność 23%; 90 mg (0.23 mmol) bezbarwnego oleju; *R_f*

= 0.20 (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.26 (t, 7.2 Hz, 3H, CH₃), 3.80-3.92 (m, 2H, CH₂CH=CH₂), 3.92-4.04 (m, 4H, NHCH₂CO), 4.06 (s, 2H, NCH₂CO), 4.17 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 5.10 (s, 2H, CH₂Ph), 5.13-5.30 (m, 2H, CH=CH₂), 5.66-5.82 (m, 1H, CH=CH₂), 5.87 (br s, 1H, NHC(O)O), 6.96 (br s, 1H, NH), 7.34 (s, 5H, ArH); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.4, 41.4, 42.1, 42.7, 49.9, 50.8, 61.7, 67.2, 118.4, 128.2, 128.4, 128.7, 131.5, 136.6, 156.6, 168.9, 170.0; Analiza elementarna obliczona dla C₁₉H₂₅N₃O₆: C, 58.30; H, 6.44; N, 10.74; zbadana: C, 58.12; H, 6.64; N, 10.52.

9. Literatura cytowana

1. Domling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168-3210.
2. Ugi, I. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *71*, 187-191.
3. Domling, A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 17-89.
4. Armstrong, R. W.; Combs, A. P.; Tempest, P. A.; Brown, S. D.; Keating, T. A. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 123-131.
5. Domling, A. *Org. Chem. Highlights*, 2005.
6. Zhu, J.; Bienayme, H. *Multicomponent reactions*; Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
7. Ugi, I.; Werner, B.; Domling, A. *Molecules* **2003**, *8*, 53-66.
8. Ugi, I.; Meyr, R. *Angew. Chem.* **1958**, *70*, 702-703.
9. Ugi, I.; Steinbruckner, C. *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 734-742.
10. Pirrung, M. C.; Sarma, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 444-445.
11. Simila, S. T. M.; Martin, S. F. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4501-4504.
12. Basso, A.; Banfi, L.; Guanti, G.; Riva, R.; Riu, A. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6109-6111.
13. Krasavin, M.; Busel, A.; Parchinsky, V. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5945-5940.
14. Denmark, S. E.; Fan, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7825-7827.
15. Godet, T.; Bonvin, Y.; Vincent, G.; Merle, D.; Thozet, A.; Ciufolini, M. A. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3281-3284.
16. Ramon, D. J.; Yus, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1602-1634.
17. Bock, H.; Ugi, I. *J. Prakt. Chem.* **1997**, *339*, 385-389.
18. Piscopio, A. D.; Miller, J. F.; Koch, K. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8189-8198.
19. Tsuchida, K.; Mizuno, Y.; Ikeda, K. *Heterocycles* **1981**, *15*, 883-887.
20. Rossen, K.; Sager, J.; DiMichele, L. M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3183-3186.
21. Hulme, C.; Morrissette, M. M.; Volz, F. A.; Burns, C. J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1113-1116.
22. Kazmaier, U.; Hebach, C.; Watzke, A.; Maier, S.; Mues, H.; Huch, V. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 136-145.
23. Hebach, C.; Kazmaier, U. *Chem. Commun.* **2003**, 596-597.
24. Kunz, H.; Pfengle, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 651-652.
25. Sutherlin, D. P.; Stark, T. M.; Hughes, R.; Armstrong, R. W. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8350-8354.
26. Nenajdenko, V. G.; Reznichenko, A. L.; Balenkova, E. S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3031-3041.
27. Kazmaier, U.; Hebach, C. *Synlett* **2003**, 1591-1594.
28. Pick, R.; Bauer, M.; Kazmaier, U.; Hebach, C. *Synlett* **2005**, 757-760.
29. Costa, S. P. G.; Maia, H. L. S.; Pereira-Lima, S. M. M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1475-1479.
30. Sheehan, S. M.; Masters, J. J.; Wiley, M. R.; Young, S. C.; Liebeschuetz, J. W.; Jones, S. D.; Murray, C. W.; Franciskovich, J. B.; Engel, D. B.; Weber, W. W.; Marimuthu, J.; Kyle, J. A.; Smallwood, J. K.; Farmen, M. W.; Simth, G. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2255-2259.
31. Bayer, T.; Riemer, C.; Kessler, H. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 250-261.
32. Waki, M.; Meienhofer, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6075-6082.

33. Pinto, F. C. S. C.; Pereira-Lima, S. M. M. A.; Ventura, C.; Albuquerque, L.; Goncalves-Maia, R.; Maia, H. L. S. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8184-8198.
34. Maison, W.; Schlemminger, I.; Westerhoff, O.; Martens, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 581-584.
35. Kim, S. W.; Shin, Y. S.; Ro, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1665-1668.
36. Banfi, L.; Basso, A.; Guanti, G.; Riva, R. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7655-7658.
37. O'Neil, I. A. *Synthesis: Carbon with one heteroatom attached by a multiple bond. Isocyanides and their heteroanalogues*; Elsevier Science Ltd.: Cambridge, UK, 1995; Vol. 3.
38. Berłozęcki, S.; Szymański, W.; Ostaszewski, R. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9780.
39. Owens, T. D.; Araldi, G.-L.; Nutt, R. F.; Semple, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6271-6274.
40. Zhu, J.; Wu, X.; Danishefsky, S. J. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 577-579.
41. Bayer, T.; Riemer, C.; Kessler, H. *J. Peptide Sci.* **2001**, *7*, 250-261.
42. Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9367-9371.
43. Yoo, B.; Kirshenbaum, K. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 714-721.
44. Rivera, D. G.; Wessjohann, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7122-7123.
45. Rivera, D. G.; Wessjohann, L. A. *Molecules* **2007**, *12*, 1890-1899.
46. Bradley, H.; Fitzpatrick, G.; Glass, W. K.; Kunz, H.; Murphy, P. V. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2629-2632.
47. Murphy, P. V.; Bradley, H.; Tosin, M.; Pitt, N.; Fitzpatrick, G. M.; Glass, W. K. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5692-5704.
48. Liu, L.; Li, C. P.; Cochran, S.; Ferro, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2221-2226.
49. Barreto, A. d. F. S.; Vercillo, O. E.; Andrade, C. K. Z.; Wessjohann, L. A. "Microwave-assisted synthesis of peptoids"; 13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2009 Sao Pedro, Brasil.
50. Vercillo, O. E.; Andrade, C. K. Z.; Wessjohann, L. A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 205-208.
51. Schmitt, J. S.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. "Synthesis of cyclic RGD-tetra-peptoids and optimization of the submonomer solid phase coupling protocol"; Peptides Frontiers of Peptide Science, 1997, Nashville, Tennessee, U.S.A.
52. Mizushima, T.; Tsukihara, T. *Protein crystallography in drug discovery*; Wiley-VCH: Weinheim, 2004.
53. Elofsson, M.; Splittgerber, U.; Myung, J.; Mohan, R.; Crews, C. M. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 811-822.
54. Wilk, S.; Orłowski, M. *J. Neurochem.* **1983**, *41*, 69-75.
55. Reed, S. I. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 855-864.
56. Vierstra, R. D. *Trends Plant Sci.* **2003**, *8*, 135-142.
57. Campbell, D. S.; Holt, C. E. *Neuron* **2001**, *32*, 1013-1026.
58. Conaway, R. C.; Brower, C. S.; Conaway, J. W. *Science* **2002**, *296*, 1254-1258.
59. Almond, J. B.; Cohen, G. M. *Leukemia* **2002**, *16*, 433-443.
60. Kisselev, A. F.; Goldberg, A. L. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 739-758.
61. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/.

62. Myung, J.; Kim, K. B.; Crews, C. M. *Med. Res. Rev.* **2001**, *21*, 245-273.
63. Stein, R. L.; Melandri, F.; Dick, L. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3899-3908.
64. Mayer, J. R.; Ciechanover, A. J.; Rechsteiner, M. *Protein degradation, ubiquitin and the chemistry of life*; Wiley-VCH: Weinheim, 2005; Vol. 1.
65. Marques, A. J.; Palanimurugan, R.; Matias, A. C.; Ramos, P. C.; Dohmen, R. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1509-1536.
66. Stephan, M. M. *The Scientist* **2005**, *19*, 26-27.
67. Verdoes, M.; Florea, B. I.; Marel, G. A. v. d.; Overkleeft, H. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3301-3313.
68. Groll, M.; Ditzel, L.; Lowe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Hans D, B.; Huber, R. *Nature* **1997**, *386*, 463-471.
69. Saeki, Y.; Tanaka, K. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 865-867.
70. Nandi, D.; Tahiliani, P.; Kumar, A.; Chandu, D. *J. Biosci.* **2007**, *31*, 137-155.
71. Goldberg, A. L.; Stein, R.; Adams, J. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 503-508.
72. Schechter, I.; Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157-162.
73. Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1129-1143.
74. Borissenko, L.; Groll, M. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687-717.
75. Heinemeyer, W.; Fischer, M.; Krimmer, T.; Stachon, U.; Wolf, D. H. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25200-25209.
76. Kisselev, A. F.; Callard, A.; Goldberg, A. L. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8582-5890.
77. Kuramochi, H.; Nakata, H.; Ishij, S.-i. *J. Biochem.* **1979**, *86*, 1401-1410.
78. Kawada, M.; Umezawa, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *209*, 25-30.
79. Costabel, M.; Vallejo, D. F.; Grigera, J. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *394*, 161-166.
80. Osmak, M.; Korbelik, M.; Suhar, A.; Skrk, J.; Turk, V. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1989**, *16*, 707-714.
81. Stein, R. L.; Ma, Y.-T.; Brand, S., 1997.
82. Adams, J.; Behnke, M.; Chen, S.; Cruickshank, A. A.; Dick, L. R.; Grenier, L.; Klunder, J. M.; Ma, Y.-T.; Plamondon, L.; Stein, R. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 333-338.
83. Adams, J.; Palombella, V. J.; Sausville, E. A.; Johnson, J.; Destree, A.; Lazarus, D. D.; Maas, J.; Pien, C. S.; Prakash, S.; Elliott, P. J. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2615-2622.
84. Lowe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumaeister, W.; Huber, R. *Science* **1995**, *268*, 533-539.
85. Palombella, V. J.; Rando, O. J.; Goldberg, A. L.; Maniatis, T. *Cell* **1994**, *78*, 773-785.
86. Tsubuki, S.; Saito, Y.; Tomioka, M.; Ito, H.; Kawashima, S. *J. Biochem.* **1996**, *119*, 572-576.
87. Zhang, S.; Shi, Y.; Jin, H.; Liu, Z.; Zhang, L.; Zang, L. *J. Mol. Model.* **2009**.
88. Zhu, Y.-Q.; Pei, J.-F.; Liu, Z.-M.; Lai, L.-H.; Cui, J.-R.; Li, R.-T. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1483-1496.
89. Yuan, B.-Z.; Chapman, J. A.; Reynolds, S. H. *Transl. Oncol.* **2008**, *1*, 129-140.
90. Domingo-Domenech, J.; Pippa, R.; Tapia, M.; Gascon, P.; Bachs, O.; Bosh, M. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *112*, 53-62.
91. Pajonk, F.; Ophoven, A. v.; Weissenberger, C.; McBride, W. H. *BMC Cancer* **2005**, *5*, 76.

92. Yan, X.-B.; Yang, D.-S.; Gao, X.; Feng, J.; Shi, Z.-L.; Ye, Z. *Cell Biol. Int.* **2007**, *31*, 1136.
93. Yang, L.; Wang, S.; Lim, G.; Sung, B.; Zeng, Q.; Mao, J. *Pain* **2008**, *140*, 472-478.
94. Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815-3818.
95. Jones, J. *Amino acid and peptide synthesis*, 2nd ed.: Oxford 2002.
96. Adams, J.; Ma, Y.-T.; Stein, R.; Baevsky, M.; Grenier, L.; Plamondon, L., 2006.
97. Elliott, P. J.; Zollner, T. M.; Boehncke, W.-H. *J. Mol. Med.* **2003**, *81*, 235-245.
98. Lynas, J. F.; Harriott, P.; Healy, A.; McKervey, M. A.; Walker, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 373-378.
99. Crawford, L. J. A.; Walker, B.; Ovaa, H.; Chauhan, D.; Anderson, K. C.; Morris, T. C. M.; Irvine, A. E. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6379-6386.
100. Adams, J.; Kauffman, M. *Cancer Invest.* **2004**, *22*, 304-311.
101. Shah, M. H.; Young, D.; Kindler, H. L.; Webb, I.; Kleiber, B.; Wright, J.; Grever, M. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 6111-6118.
102. Hideshima, T.; Richardson, P.; Chauhan, D.; Palombella, V. J.; Elliott, P. J.; Adams, J.; Anderson, K. C. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 3071-3076.
103. <http://www.janssen-cilag.pl/product/detail.jhtml?itemname=velcade>. *Charakterystyka produktu leczniczego*.
104. Chauhan, D.; Hideshima, T.; Anderson, K. C. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *24*, 465-476.
105. Denlinger, C. E.; Keller, M. D.; Mayo, M. W.; Broad, R. M.; Jones, D. R. *J. Thorac. Cardio. Sur.* **2004**, *127*, 1078-1086.
106. Adams, J.; Ma, Y.-T.; Stein, R.; Baevsky, M.; Grenier, L.; Plamondon, L., 1998.
107. Meng, L.; Mohan, R.; Kwok, B. H. B.; Elofsson, M.; Sin, N.; Crews, C. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10403-10408.
108. Meng, L.; Kwok, B. H. B.; Sin, N.; Crews, C. M. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2798-2801.
109. Groll, M.; Kim, K. B.; Kairies, N.; Huber, R.; Crews, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237-1238.
110. Demo, S. D.; Kirk, C. J.; Aujay, M. A.; Buchholz, T. J.; Dajee, M.; Ho, M. N.; Jiang, J.; Laiding, G. J.; Lewis, E. R.; Parlanti, F.; Shenk, K. D.; Smyth, M. S.; Sun, C. M.; Vallone, M. k.; Woo, T. M.; Molineaux, C. J.; Benneth, M. K. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6383-6391.
111. Kim, K. B.; Fonseca, F. N.; Crews, C. M. *Methods Enzymol.* **2005**, *399*, 585-609.
112. Bogyo, M.; McMaster, J. S.; Gaczynska, M.; Tortorella, D.; Goldberg, A. L.; Ploegh, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6629-6634.
113. Overkleeft, H. S.; Bos, P. R.; Hekking, B. G.; Gordon, E. J.; Ploegh, H. L.; Kessler, B. M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6005-6009.
114. Corey, E. J.; Li, W.; Nagamitsu, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1676-1679.
115. Saravanan, P.; Corey, E. J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2760-2764.
116. Reddy, L. R.; Fournier, J.-F.; Reddy, B. V. S.; Corey, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8974-8976.
117. Gilley, C. B.; Buller, M. J.; Kobayashi, Y. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3631-3634.
118. Groll, M.; Schellenberg, B.; Bachmann, A. S.; Archer, C. R.; Huber, R.; Powell, T. K.; Lindow, S.; Kaiser, M.; Dudler, R. *Nature* **2008**, *452*, 755-759.
119. Clerc, J.; Groll, M.; Illich, D. J.; Bachmann, A. S.; Huber, R.; Schellenberg, B.; Dudler, R.; Kaiser, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6507-6515.

120. Coste, A.; Couty, F.; Evano, G. *C. R. Chimie* **2008**, *11*, 1544-1573.
121. Basse, N.; Piguel, S.; Papapostolou, D.; Ferrier-Berthelot, A.; Richy, N.; Pagano, M.; Sathou, P.; Sobczak-Thepot, J.; Vidal, M. R.-R. *J. J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2842-2850.
122. Garcia-Echeverria, C.; Imbach, P.; France, D.; Furst, P.; Lang, M.; Noorani, M.; Scholz, D.; Zimmermann, J.; Furet, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1317-1319.
123. Furet, P.; Imbach, P.; Fuerst, P.; Lang, M.; Noorani, M.; Zimmermann, J.; Garcia-Echeverria, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1321-1324.
124. Furet, P.; Imbach, P.; Fuerst, P.; Lang, M.; Noorani, M.; Zimmermann, J.; Garcia-Echeverria, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1331-1334.
125. Furet, P.; Imbach, P.; Noorani, M.; Koeppler, J.; Laumen, K.; Lang, M.; Guagnano, V.; Fuerst, P.; Roesel, J.; Zimmermann, J.; Garcia-Echeverria, C. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4810-4813.
126. Lim, H.-S.; Archer, C. T.; Kodadek, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7750-7751.
127. Lim, H.-S.; Cai, D.; Archer, C. T.; Kodadek, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12936-12937.
128. Suto, M. J.; Sullivan, R. W.; Ransone, L. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2925-2930.
129. Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
130. Leban, J.; Blisse, M.; Krauss, B.; Rath, S.; Baumgartner, R.; Seifer, M. H. *J. Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4579-4588.
131. Webber, S. E.; Okano, K.; Little, T. L.; Reich, S. H.; Xin, Y.; Fuhrman, S. A.; Love, D. A. M. R. A.; Hendrickson, T. F.; Patick, A. K.; James W. Meador, I.; Ferre, R. A.; Brown, E. L.; Ford, C. E.; Binford, S. L.; Worland, S. T. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2786-2805.
132. Jurczak, J.; Gołębowski, A. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 149-164.
133. Ito, A.; Takahashi, R.; Baba, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 3081-3087.
134. Rittle, K. E.; Homnick, C. F.; Ponticello, G. S.; Evans, B. E. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3016-3018.
135. Jurczak, J.; Gryko, D.; Kobrzycka, E.; Gruza, H.; Prokopowicz, P. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6051-6064.
136. Vinitzky, A.; Michaud, C.; Powers, J. C.; Orłowski, M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9421-9428.
137. Pfitzner, K. E.; Moffat, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5670-5678.
138. Ganneau, C.; Moulin, A.; Demange, L.; Martinez, J.; Fehrentz, J.-A. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 497-501.
139. Hall, B. J.; Sutherland, J. D. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6593-6596.
140. Fehrentz, J. A.; Paris, M.; Heitz, A.; Velek, J.; Winternitz, F.; Matinez, J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6792-6796.
141. O'Donnell, M. J.; Drew, M. D.; Pottorf, R. S.; Scott, W. L. *J. Comb. Chem.* **2002**, *2*, 172-181.
142. Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry*, 5th ed.; Springer: Berlin, 2004.
143. So, J.-E.; Kang, S.-H.; Kim, B.-G. *Enz. Microb. Technol.* **1998**, *23*, 211-215.
144. Ulijn, R. V.; Bisek, N.; Flitsch, S. L. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 621-622.
145. Bogenstatter, M.; Steglich, W. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 7267-7274.
146. Chen, S.-T.; Wu, S.-H.; Wang, K.-T. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 347-350.

147. Mohle, K.; Hofmann, H.-J. *J. Mol. Model.* **1996**, *2*, 307-311.
148. LeTiran, A.; P.Stables, J.; Kohn, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2693-2708.
149. Kwon, Y.-U.; Kodadek, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1508-1509.
150. Saha, U. K.; Roy, R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7697-7700.
151. Mas-Moruno, C.; Cruz, L. J.; Mora, P.; Francesch, A.; Messeguer, A.; Perez-Paya, E.; Albericio, F. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2443-2449.
152. Chongsiriwatana, N. P.; Patch, J. A.; Czyzewski, A. M.; Dohm, M. T.; Ivankin, A.; Gidalevitz, D.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2794-2799.
153. Kruijtzter, J. A. W.; Liskamp, R. M. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6969-6972.
154. Maayan, G.; Yoo, B.; Kirshenbaum, K. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 335-338.
155. Gorske, B. C.; Jewell, S. A.; Guerard, E. J.; Blackwell, H. E. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1521-1524.
156. Lieke, W. *Ann. Chem. Pharm.* **1859**, *112*, 316-321.
157. Patte, F.; Etcheto, M.; Laffort, P. *Chem. Senses* **1975**, *1*, 283-305.
158. Gokel, G. W.; Widera, R. P.; Weber, W. P. *Org. Synth.* **1976**, *55*, 96-98.
159. Coffin, A. R.; Roussell, M. A.; Tserlin, E.; Pelkey, E. T. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6678-6681.
160. Amato, F.; Maracaccini, S. *Org. Synth.* **2005**, *82*, 18-21.
161. Hartman, G. D.; Weinstock, L. M. *Org. Synth.* **1979**, *6*, 620-625.
162. Myers, M. C.; Pokorski, J. K.; Apella, D. H. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4699-4702.
163. Bull, S. D.; Davies, S. G.; Delgado-Ballester, S.; Kelly, P. M.; Kotchie, L. J.; Gianotti, M.; Laderas, M.; Smith, A. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 3112-3121.
164. Jiang, W.-Q.; Costa, S. P. G.; Maia, H. L. S. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3804-3810.
165. Giard, T.; Benard, D.; Plaquevent, J.-C. *Synthesis* **1998**, 297-300.
166. Burgess, E. M.; Penton, H. R.; Taylor, E. A. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 26-31.
167. Khapli, S.; Dey, S.; Mal, D. *J. Indian Ins. Sci.* **2001**, *81*, 461-476.
168. Mroczkiewicz, M.; Ostaszewski, R. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4025-4034.
169. Wong, S.-C.; Green, G. D. J.; Shaw, E. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 456-459.
170. Tramontano, A.; Ivanov, B.; Gololobov, G.; Paul, S. *Appl. Biochem. Biotech.* **2000**, *83*, 233-243.
171. Sieńczyk, M.; Oleksyszyn, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2886-2890.
172. Sieńczyk, M.; Oleksyszyn, J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7251-7254.
173. Boduszek, B.; Oleksyszyn, J.; Kam, C.-M.; Selzler, J.; Smith, R. E.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3969-3976.
174. Grzywa, R.; Dyguda-Kazimierowicz, E.; Sieńczyk, M.; Feliks, M.; Sokalski, W. A.; Oleksyszyn, J. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 677-683.
175. Sieńczyk, M.; Lesner, A.; Wysocka, M.; Łęgowska, A.; Pietrusiewicz, E.; Rolka, K.; Oleksyszyn, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8863-8867.
176. Rachoń, J.; Schollkopf, U.; Wintel, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 709-718.
177. Rachoń, J.; Schollkopf, U. *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 1693-1698.
178. Cummings, T. F.; Shelton, J. R. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 419-423.
179. Lum, R. T.; Nelson, M. G.; Joly, A.; Horsma, A. G.; Lee, G.; Meyer, S. M.; Wick, M. M.; Schow, S. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 209-214.

180. Estiarte, M. A.; Elder, A. M.; Rich, D. H. "Synthetic progress towards a TMC-95 analogue as a potential proteasome inhibitor"; *Peptides: The wave of the future*, 2001, San Diego, California, USA.
181. Wang, L.; Lum, R. T.; Schow, S. R.; Joly, A.; Kerwar, S.; Wick, M. M., 2000.
182. Kalgutkar, A. S.; Crews, B. C.; Rowlinson, S. W.; Marnett, A. B.; Kozak, K. R.; Remmel, R. P.; Marnett, L. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 925-930.
183. Pettipher, R.; Hansel, T. T.; Armer, R. *Nature Rev.* **2007**, *6*, 313-325.
184. McKew, J. C.; Foley, M. A.; Thakker, P.; Behnke, M. L.; Lovering, F. E.; Sum, F.-W.; Tam, S.; Wu, K.; Shen, M. W. H.; Zhang, W.; Gonzalez, M.; Liu, S.; Mahadevan, A.; Sard, H.; Khor, S. P.; Clark, J. D. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 135-158.
185. Wagaw, S.; Yang, B. H.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10251-10263.
186. Japp, F. R.; Klingermann, F. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20*, 2942-2944.
187. Pirrung, M. C.; Sarma, K. D. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11456-11472.
188. Schroder, T.; Niemeier, N.; Agonin, S.; Ulrich, A. S.; Krug, H. F.; Brase, S. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 376-379.
189. Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification of laboratory Chemicals*, 4th ed.; Elsevier: Oxford, 2000.
190. Mroczkiewicz, M.; Fryszkowska, A.; Ostaszewski, R. *Biotechnologia* **2005**, *69*, 32-47.
191. Bergmann, M.; Zervas, L. *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 1192-1201.
192. Anbazhagan, M.; Reddy, T. I.; Rajappa, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1923-1628.
193. Moriniere, J. L.; Danree, B.; Lemoine, J.; Guy, A. *Synth. Commun.* **1988**, *12*, 441-444.
194. Clayton, G. C. *Chem. Ber.* **1895**, *28*, 1665-1669.
195. Keller, O.; Keller, W. E.; van Look, G.; Wersin, G. *Org. Synth.* **1985**, *63*, 160-166.
196. Hadfield, P. S.; Galt, R. H. B.; Sawyer, Y.; Layland, N. J.; Page, M. I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 503-510.
197. Schott, H. F.; Larkin, J. B.; Rockland, L. B.; Dunn, M. S. *J. Org. Chem.* **1947**, *12*, 490-495.
198. Anand, R. C.; Vimal. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 917-918.
199. Schollkopf, U.; Schroder, R.; Stafforst, D. *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 44-53.
200. Pressman, D.; Bryden, J. H.; Pauling, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 1352-1358.