





INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

mgr inż. Sylwester Kurcoń

PRACA DOKTORSKA

---

**Selektywne modyfikacje pochodnych  
kwasu kobyrnowego –  
nowe regulatory cyklazy guanylowej**

---

Praca przedstawiona Radzie Naukowej  
Instytutu Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
celem uzyskania tytułu doktora nauk chemicznych

Promotor:  
dr hab. Dorota Gryko, prof. nadzw.

Promotor pomocniczy:  
dr Keith ó Proinsias

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

**O-B.361/14**



9000000018751

Warszawa 2014

<http://rcin.org.pl>



B. Org. 361/14



INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ  
POLSKA AKADEMIA NAUK

UNIA EUROPEJSKA  
EUROPEJSKI FUNDUSZ  
ROZWOJU REGIONALNEGO



Praca doktorska wykonana w ramach projektu:

*Novel approach towards NO-free activators of sGC enzyme  
for medical treatment of heart diseases.*

Projekt realizowany w ramach programu TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej,  
współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Numer grantu: TEAM/2009-3/4



THE UNIVERSITY of TEXAS  
HEALTH SCIENCE CENTER AT HOUSTON

Badania biologiczne zostały wykonane przez Emila Martina  
w the University of Texas Health Science Center w Houston.



**Część wyników przedstawionych w niniejszej pracy została opublikowana w artykułach:**

K. ó Proinsias, J. L. Sessler, S. Kurcoń, D. Gryko,  
New Hydrophobic Vitamin B<sub>12</sub> Derivatives via Ring-Opening Reactions of *c*-Lactone.  
*Org. Lett.* **2010**, *12*, 4674-4677.  
<http://dx.doi.org/10.1021/ol102008n>

K. ó Proinsias, S. Kurcoń, D. Gryko,  
Hydrophobic Vitamin B<sub>12</sub> Derivatives: Unprecedented Formation of a 7-Membered Lactam.  
*Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *1*, 154-159.  
<http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201101249>

S. Kurcoń, K. ó Proinsias, D. Gryko,  
Cobryketone Derived from Vitamin B<sub>12</sub> via Palladium-Catalyzed Cleavage of the sp<sup>3</sup>-sp<sup>3</sup>  
Carbon-Carbon Bond.  
*J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4115-4122.  
<http://dx.doi.org/10.1021/jo4004629>

**Wyniki przedstawione w niniejszej pracy były prezentowane na konferencjach:**

Chemsession 10', Warszawa, 2010  
Selective modification of hydrophobic vitamin B<sub>12</sub> derivatives – plakat.

Chemsession 11', Warszawa, 2011  
*mezo*-Podstawione hydrofobowe pochodne witaminy B<sub>12</sub> – plakat.

Chemsession 12', Warszawa, 2012  
*mezo*- oraz *d*- Funkcjonalizowane hydrofobowe pochodne witaminy B<sub>12</sub> – plakat.

The 18th European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2013), Marsylia, 2013  
Vitamin B<sub>12</sub> modifications: *d*-position targeted – plakat.

56. Zjazd Naukowy PTChem i SITPChem, Siedlce, 2013  
Hydrofobowe pochodne witaminy B<sub>12</sub> – selektywne modyfikacje w pozycji *d*- – prezentacja ustna.



## Podziękowania

W tym miejscu pragnę podziękować wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy.

*dr hab. Dorocie Gryko dziękuję za cierpliwość i dobroć, możliwość pracy w fantastycznej atmosferze, prowadzenie po torach i wytyczanie ścieżek.*

*Keithowi za dzielenie przestrzeni laboratorium oraz rady praktyczne i cenne.*

*Mikołajowi za poświęcony czas, wysłuchiwanie narzekań i przyjaźń.*

*Rafałowi i Kseni za wiele często drobnych (i nie tylko) rzeczy, które dużo dla mnie znaczą.*

*Całemu zespołowi XV, a zwłaszcza: Dominice, Sabinie, Maćkowi i Maksowi.*

*Tomkowi za zawracanie głowy i wywracanie wszystkiego do góry nogami.*

*Grażynie Groszek i Agnieszce Nowak-Król, bez których nie byłoby mnie tutaj.*

*Irence Mackiewicz, niestrudzonej i niezawodnej babuni.*

*Rodzicom.*

*Kai, za wiarę we mnie, cierpliwość, którą notorycznie wyczerpywałem i poświęcenie.  
Halszce, za uśmiech i bezinteresowną miłość.*

**Dziękuję**



## Streszczenie:

Rozpuszczalna cyklaza guanylowa jest enzymem katalizującym przemianę guanozynotrójfosforanu w cykliczny guanozynomonofosforan. Powstawanie tego ostatniego uruchamia cykl przemian biochemicznych, które między innymi, prowadzą do rozkurczu mięśni gładkich, z których zbudowane są naczynia krwionośne. Wstępne prace przeprowadzone przez E. Martina wykazały, że kobinamid aktywuje ten enzym.

Celem pracy było znalezienie nowych, selektywnych metod modyfikacji pochodnych kwasu kobyrynowego, synteza nowych pochodnych tego związku oraz zbadanie ich wpływu na rozpuszczalną cyklazę guanylową.

W toku badań opracowałem metodę selektywnego otwierania *c*-laktonu aminami, prowadzącą, w zależności od warunków reakcji, do mono- i diamidów lub spirolaktonu. Ten ostatni związek został wykorzystana jako prekursor selektywnych modyfikacji w pozycji *d*- (*Org. Lett.* **2010**, *12*, 4674-4677).

Otrzymałem szereg pochodnych kwasu kobyrynowego sfunkcjonalizowanych w pozycji *mezo*-. Pożądane amidy tworzyły się w reakcji *mezo*-aminy **5** z kwasami karboksylowymi, bezwodnikami lub chlorkami kwasowymi. W reakcjach tych tworzył się produkt uboczny - laktam **302**. Ta nowa pochodna pozwoliła mi na opracowanie metody selektywnej modyfikacji heptaestru metyloвого kwasu kobyrynowego w pozycji *d*- (*Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *1*, 154-159).

Podczas prób bezpośredniego arylowania heptaestru **3** w pozycji *mezo*- odkryłem, że związek ten w obecności katalizatorów palladowych i tlenu przekształca się w kobryketon **313** – związek nieposiadający podstawnika w pozycji *d*-. Opracowałem metodę jego syntezy i wykazałem, że jest on dobrym prekursorem *d-nor-c*-amidów (*J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4115-4122).

Zsyntetyzowane związki poddane zostały badaniom biologicznym w grupie E. Martina w the University of Texas, Health Science Center w Houston, które wykazały, że podstawnik w pozycji *d*- odgrywa istotną rolę w procesie aktywacji rozpuszczalnej cyklazy guanylowej. Ponadto, *c,d*-izopropyloamidy aktywują sGC lepiej niż kobinamid, a wprowadzanie podstawników w pozycję *mezo*- osłabia właściwości aktywujące pochodnych kwasu kobyrynowego.

## **Abstract:**

Soluble guanylyl cyclase (sGC) is an enzyme which catalyze transformation of guanosine triphosphate (GTP) to cyclic guanosine monophosphate (cGMP), which triggers further biochemical effects that ultimately result in vasodilatation of blood vessels. Preliminary experiments made in E. Martin group showed that cobinamide, a derivative of vitamin B<sub>12</sub>, activates sGC.

The main aim of my work was to develop new methodologies for the selective synthesis of novel cobyrinic acid derivatives and examine their influence on sGC enzyme.

During my work the synthesis of mono- and diamide derivatives, including the spirolactone intermediate, was achieved *via c*-lactone opening using various primary amines. This is the first known example of selective *d*-position modification (*Org. Lett.* **2010**, *12*, 4674-4677).

Furthermore, selective *meso*-functionalized cobyrinic acid derivative, *meso*-amine **5**, was synthesized. This allowed for reactions with carboxylic acids, anhydrides and acid chlorides. In coupling reactions a lactam **302** by-product was isolated and analyzed. Manipulation of this compound led to selective *d*-/*meso*- modifications (*Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *1*, 154-159).

During attempts to directly arylate heptaester cobryinate **3** at the *meso*- position it was discovered that in the presence of oxygen and a palladium catalyst it transformed into cobryketone **313**. The method was fully optimized and allowed for the synthesis of *d*-*nor-c*-amides (*J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4115-4122).

Obtained compounds were submitted for biological tests to the E. Martin group at University of Texas, Health Science Center, Houston. The results showed that *c,d*-diisopropylamide activates sGC better than cobinamide. Furthermore, modification of the *meso*-position showed a dramatic decline in sGC activation. This is also true when the *d*-position is elimination, highlighting its importance.

## Wykaz stosowanych skrótów

<b>acac</b>	acetyloaceton
<b>Be<sub>6</sub></b>	bakteriochloryna e <sub>6</sub>
<b>BNCT</b>	terapia borowo-neutronową
<b>Boc</b>	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
<b>BOP</b>	reagent Castro, heksafluorofosforan benzotriazol-1-iloxy-tris-(dimetyloamino)-fosfonowy
<b>BR</b>	róż bengalski
<b>CAN</b>	azotan cerowoamonowy
<b>Ce<sub>6</sub></b>	chloryna e <sub>6</sub>
<b>cGMP</b>	guanozyno-3',5'-monofosforan
<b>Cp<sub>6</sub></b>	chloryna p <sub>6</sub>
<b>CuAAC</b>	katalizowana miedzią 1,3-dipolarna cykloaddycja azydku do alkinu
<b>dba</b>	dibenzylidenoaceton
<b>DBU</b>	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
<b>DCC</b>	dicykloheksylokarbodiimid
<b>DCE</b>	dichloroetan
<b>DCM</b>	dichlorometan
<b>DCVC</b>	suchokolumnowa chromatografia próżniowa
<b>DDQ</b>	2,3-dichloro-5,6-dicyjanobenzochinon
<b>DEAD</b>	ester etylowy kwasu azadikarboksylowego
<b>DEPC</b>	cyjanofosfonian dietylu
<b>DIPA</b>	diizopropylamina
<b>DIPEA</b>	diizopropylodietylamina
<b>DMA</b>	dimetyloacetamid
<b>DMAD</b>	ester dimetylowy kwasu acetylenodikarboksylowego
<b>DMAP</b>	4-dimetyloaminopirydyna
<b>DMF</b>	dimetyloformamid
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek
<b>dppf</b>	1,1'-Bis(difenylofosfino)ferrocen
<b>EDC</b>	1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid
<b>EDTA</b>	kwas wersenowy
<b>FRET</b>	<i>ang.</i> Förster Resonance Energy Transfer, bezpromienisty transfer energii pomiędzy chromoforami
<b>GTP</b>	guanozyno-5'-trifosforan
<b>HBTU</b>	heksafluorofosforan 2-(1H-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
<b>HDL</b>	lipoproteiny wysokiej gęstości
<b>HOBt</b>	1-hydroksybenzotriazol
<b>HPIX</b>	hematoporfiryna IX
<b>HPLC</b>	wysokosprawna chromatografia cieczowa
<b>HPPH</b>	3-(1'-heksyloksyetylo)-3-dewinylo piropeoforbid a, Photochlor <sup>®</sup>
<b>LDL</b>	lipoproteiny niskiej gęstości
<b>LDLr</b>	receptory LDL
<b>MRI</b>	obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego
<b>MW</b>	ogrzewanie mikrofalowe
<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromosukcynoimid
<b>NHS</b>	<i>N</i> -hydroksysukcynoimid

**NIR** bliska podczerwień  
**NIS** *N*-jodosukcynoimid  
**NMM** *N*-metylomorfolina  
**NMP** *N*-metylopirolidon  
**PDT** terapia fotodynamiczna  
**PEG** poli(tlenek etylenu)  
**PEI** polietylenoimina  
**Pheo a** pheoforbid *a*  
**Piv** grupa piwalowa, *t*-BuCO  
**PPF*a*** piropheoforbid *a*  
**PPIX** protoporfiryna IX  
***p*-PTS** *para*-toluenosulfonian pirydyny  
**sGC** cyklaza guanylowa  
**TBAF** fluorek tetrabutylamonowy  
**TBDMS** grupa tetrabutylodimetylosililowa  
**TBO** błękit toluidynowy O  
**TCDI** 1,1'-tiokarbonylodiimidazol  
**TEA** trietyloamina  
**TFA** kwas trifluorooctowy  
**THF** tetrahydrofuran  
**THP** tetrahydropiran  
**TLC** chromatografia cienkowarstwowa  
**TMS** tetrametylosilan  
**TsCl** chlorek tosyłu

## Spis treści

<u>1.</u>	<u>Założenia i cel pracy.....</u>	<u>14</u>
<u>2.</u>	<u>Cześć literaturowa</u>	
	<u>Naturalne porfirynoidy w biologii i medycynie.....</u>	<u>16</u>
2.1.	Porfirynoidy występujące w naturze .....	16
2.2.	Chemosensory i antidota cyjanków.....	19
2.2.1.	Pochodne kobalaminy, jako antidota w zatruciach cyjankami .....	20
2.2.2.	Pochodne kobalaminy, jako chemosensory anionu cyjankowego.....	21
2.3.	Terapia fotodynamiczna.....	25
2.3.1.	Modyfikacje chlorofilu i bakteriochlorofilu .....	29
2.3.1.1.	Połączenia pochodnych chlorofilu z cukrami.....	30
2.3.1.2.	Połączenia pochodnych chlorofilu z lipidami .....	36
2.3.1.3.	Dwufunkcyjne pochodne chlorofilu – do obrazowania i terapii fotodynamicznej.....	44
2.3.1.4.	Pozostałe modyfikacje chlorofilu .....	54
2.3.1.5.	Pochodne chlorofilu o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. ....	61
2.3.2.	Modyfikacje hemu.....	63
2.4.	Terapia borowo-neutronowa.....	66
2.4.1.	Pochodne chlorofilu w BNCT .....	67
2.4.2.	Pochodne PPIX w BNCT .....	69
2.5.	Podsumowanie.....	73
<u>3.</u>	<u>Badania własne.....</u>	<u>74</u>
3.1.	Wymiana liganda aksjalnego .....	75
3.2.	Otwieranie <i>c</i> -laktonu aminami.....	77
3.2.1.	Identyfikacja produktów reakcji <i>c</i> -laktonu z etanoloaminą.....	77
3.2.2.	Dobór rozpuszczalnika reakcji .....	81
3.2.3.	Optymalizacja reakcji otrzymywania <i>c</i> -monoamidu <b>261</b> .....	82
3.2.4.	Optymalizacja reakcji otrzymywania <i>c,d</i> -diamidu <b>262</b> .....	83
3.2.5.	Optymalizacja reakcji otrzymywania <i>d</i> -spirolaktonu <b>263</b> .....	83
3.2.6.	Zakres i ograniczenia reakcji otwierania <i>c</i> -laktonu <b>4</b> aminami .....	84
3.2.7.	Selektywna modyfikacja pochodnych kwasu kobyrynowego w pozycjach <i>c</i> - i <i>d</i> -.....	86
3.3.	<i>mezo</i> -Amidy .....	86
3.3.1.	Reakcje aminy <b>5</b> z cyklicznymi bezwodnikami .....	87
3.3.2.	Reakcje amidowania w pozycji <i>mezo</i> - .....	89
3.4.	Laktam .....	91
3.4.1.	Określenie struktury .....	91
3.4.2.	Optymalizacja syntezy laktamu <b>302</b> .....	92
3.4.3.	Modyfikacja pozycji <i>d</i> - poprzez otwieranie pierścienia laktamu <b>303</b> .....	94

3.5.	<i>Próby reakcji sprzęgania w pozycji mezo- przy użyciu katalizatorów metali przejściowych</i> .....	95
3.5.1.	Próby reakcji Sonogashiry .....	96
3.5.2.	Charakterystyka alkinu <b>310</b> .....	97
3.5.3.	Próby bezpośredniego aryłowania .....	99
3.5.4.	Próby aryłowania solami diaryljodoniowymi .....	102
3.5.5.	Podsumowanie .....	103
3.6.	<i>Dimer</i> .....	104
3.7.	<i>Kobryketon</i> .....	107
3.7.1.	Ustalenie struktury kobryketonu .....	107
3.7.2.	Otrzymywanie kobryketonu – optymalizacja syntezy .....	110
3.7.3.	Mechanizm reakcji syntezy kobryketonu.....	114
3.7.4.	Modyfikacje w pozycji c- .....	115
3.7.5.	Pentaester .....	116
3.8.	<i>Badania biologiczne otrzymanych związków</i> .....	118
<u>4.</u>	<u><i>Podsumowanie i wnioski</i></u> .....	<u>123</u>
<u>5.</u>	<u><i>Część eksperymentalna</i></u> .....	<u>125</u>
5.1.	<i>Informacje ogólne</i> .....	125
5.2.	<i>Opis syntez i charakterystyka nieznanych związków</i> .....	126
<u>6.</u>	<u><i>Literatura</i></u> .....	<u>166</u>

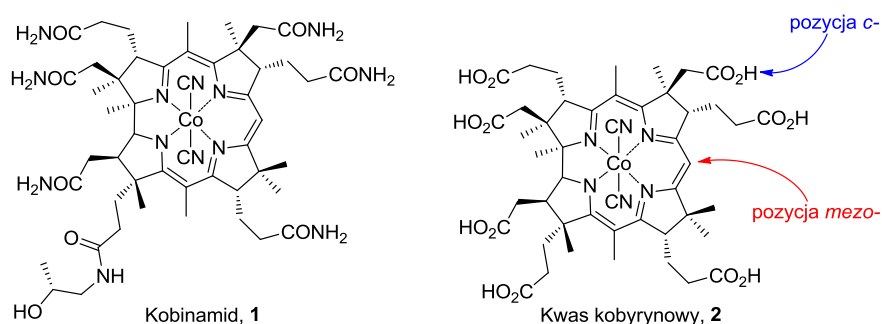


## 1. Założenia i cel pracy

Cyklaza guanylowa sGC jest enzymem katalizującym przemianę guanozyno-5'-trifosforanu (GTP) w cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan (cGMP). Poziom cGMP reguluje skurcze mięśni gładkich wpływając, między innymi, na ciśnienie krwi w krwioobieg.<sup>1</sup> Nieprawidłowe funkcjonowanie tego enzymu prowadzi do chorób serca, które obecnie są najczęstszą przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych. Z tych powodów poszukiwanie nowych regulatorów tego enzymu jest atrakcyjnym celem badawczym.<sup>2</sup>

sGC zbudowana jest z dwóch podjednostek, z których każda posiada trzy domeny: katalityczną (w której wiązany jest GTP), centralną oraz regulatorową (w której ulokowana jest cząsteczka hemu). W warunkach fizjologicznych aktywatorem sGC jest tlenek azotu(II), który łącząc się z hemem powoduje zmiany konformacyjne enzymu. Związki uwalniające w organizmie NO (np. nitrogliceryna) są często stosowanymi lekami w chorobie wieńcowej i zawałach serca. Mimo, że są one skuteczne to posiadają również szereg wad, do których należą niepożądane skutki uboczne (ból, zawroty głowy, podniesienie ciśnienia śródgałkowego, methemoglobinemia) oraz szybko wykształcająca się utrata wrażliwości na lek (tachyfilaksja). Dlatego też, poszukuje się nowych leków, działających niezależnie od NO.

Wykazano, że pewne pochodne witaminy B<sub>12</sub> (np. kobinamid, pochodne kwasu kobyrynowego, Rysunek 1) są aktywatorami sGC i oddziałują z enzymem, wykazując działanie synergistyczne z niezależnymi od NO aktywatorami wiążącymi się w domenie regulatorowej.<sup>3</sup> Mechanizm ich działania nie został, jak do tej pory, wyjaśniony. Wiadomo jednak, że nie oddziałują one ze znanym miejscem wiążącym enzymu.



Rysunek 1. Pochodne witaminy B<sub>12</sub> aktywujące sGC w domenie katalitycznej.

Podstawowym celem mojej pracy było otrzymanie nowych, selektywnie modyfikowanych pochodnych kwasu kobyrinowego jako potencjalnych aktywatorów cyklazy guanylowej.

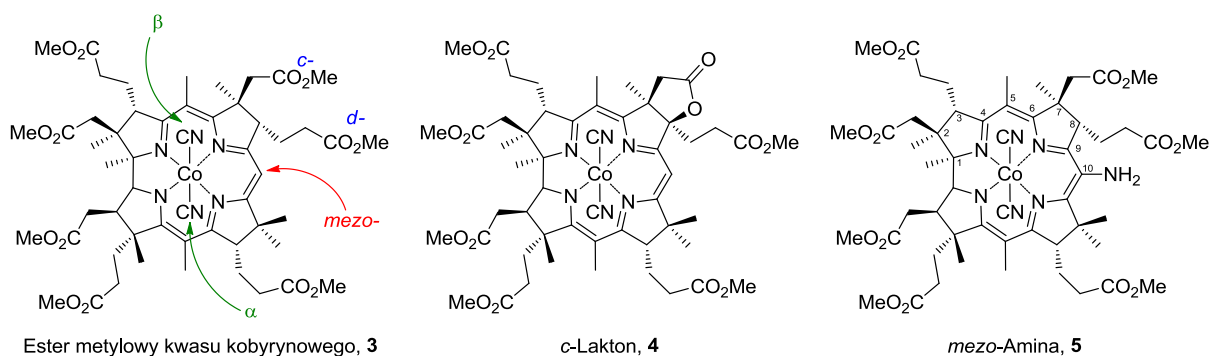
Zaprojektowanie nowych aktywatorów tego typu jest, na obecnym etapie wiedzy niemożliwe, ponieważ nie jest znany dokładny mechanizm oddziaływania pochodnych

korynowych z enzymem. Dlatego też, konieczna była synteza szeregu pochodnych kwasu kobyrynowego, aby określić elementy struktury mające istotny wpływ na proces aktywacji. Z chemicznego punktu widzenia, interesowały mnie wyłącznie funkcjonalizacje w pozycji *c*- oraz *mezo*-. Za główny cel postawiłem sobie opracowanie metody prowadzenia selektywnych modyfikacji pochodnych kwasu kobyrynowego w innych pozycjach niż dotychczas poznane.

Realizacja tak postawionego celu obejmowała:

#### A. Otrzymanie serii nowych pochodnych kwasu kobyrynowego sfunkcjonalizowanych w pozycji *c*-.

Do realizacji tego zamierzenia chciałem wykorzystać jako materiał wyjściowy znaną pochodną kwasu kobyrynowego – *c*-lakton **4** (Rysunek 2). Planowałem opracowanie metody wprowadzania różnych podstawników w pozycję *c*- w jednym etapie syntetycznym, wykorzystując reaktywność pięcioczłonowego pierścienia laktonu.



Rysunek 2. Znane selektywnie zmodyfikowane pochodne kwasu kobyrynowego.

#### B. Otrzymanie serii nowych pochodnych kwasu kobyrynowego sfunkcjonalizowanych w pozycji *mezo*-.

W tym wypadku zamierzałem *mezo*-aminę **5** przekształcać w różne pochodne w reakcji amidowania. Co prawda, w literaturze znane są przypadki otrzymywania *mezo*-amidów z wykorzystaniem aminy **5**, jednak brak jest pracy, która określiłaby najlepsze warunki prowadzenia tej reakcji. Należy również zauważyć, że *mezo*-aminę **5** otrzymuje się z witaminy B<sub>12</sub> w wyniku kilkietapowej syntezy. Z tego powodu, zamierzałem znaleźć metodę bezpośredniej modyfikacji pozycji *mezo*- wychodząc z heptaestru **3** – prekursora *mezo*-aminy **5**.

#### C. Opracowanie metody selektywnej modyfikacji pochodnych kwasu kobyrynowego w innej pozycji niż *c*- oraz *mezo*-.

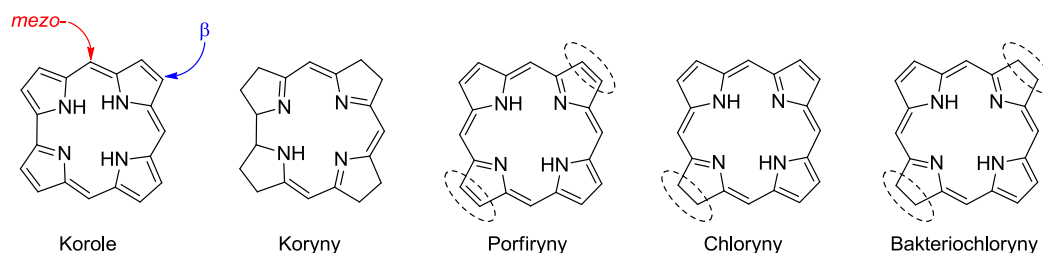
Z dostępnej literatury można było przypuszczać, że najbardziej prawdopodobne będzie znalezienie selektywnej metody wprowadzania podstawników w pozycję *d*-.<sup>4</sup>



## 2. Część literaturowa

### Naturalne porfirynoidy w biologii i medycynie

Porfirynoidy to związki zbudowane z czterech pierścieni pirolowych połączonych ze sobą bezpośrednio lub poprzez mostki węglowe. Szkielety najważniejszych porfirynoidów przedstawione są na rysunku 3. Koryny i korole posiadają trzy mostki metinowe i różnią się między sobą liczbą wiązań podwójnych w pierścieniu makrocyklicznym. Redukcja jednego lub dwóch wiązań podwójnych pierścienia porfiryny prowadzi do powstania odpowiednio chloryny i bakteriochloryny. Związki te mogą zawierać podstawniki na zewnątrz pierścienia makrocyklicznego – w pierścieniach pirolowych (pozycja  $\beta$ -) lub mostkach metinowych (pozycja *mezo*-). Wykazują one szereg ciekawych właściwości fotofizycznych i elektrochemicznych, które sprawiają, że znalazły one liczne zastosowania, między innymi jako katalizatory,<sup>5,6</sup> leki,<sup>7</sup> sensory<sup>8</sup> oraz w obrazowaniu nowotworów,<sup>9</sup> chemii materiałowej,<sup>10</sup> terapii fotodynamicznej,<sup>11</sup> terapii borowo-neutronowej<sup>12</sup> czy do wykrywania cyjanków.<sup>13</sup>



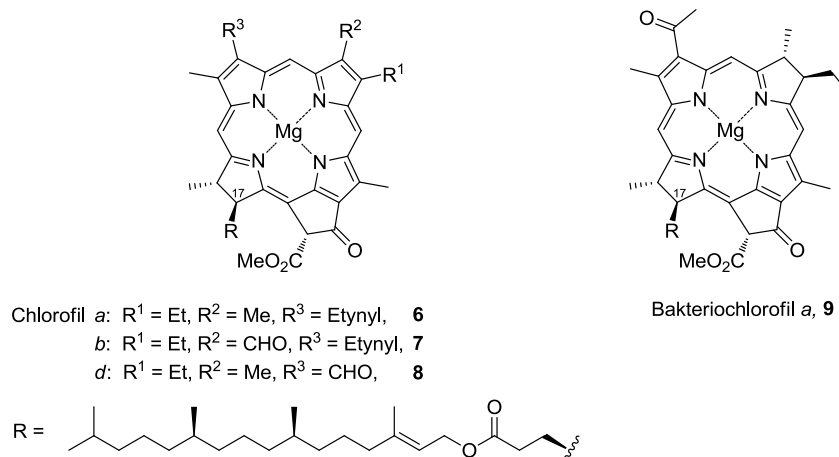
Rysunek 3. Struktury szkieletów najważniejszych tetrapiroli.

Metody syntezy porfiryn są dobrze opracowane i obecnie prace badawcze skupiają się głównie na modyfikacji ich struktur w celu uzyskania związków o ściśle określonych właściwościach. W przypadku naturalnych porfirynoidów modyfikowanie ich struktury jest trudne ze względu na stopień skomplikowania ich budowy. Duża ilość grup funkcyjnych ogranicza możliwości syntetyczne, dlatego wciąż poszukuje się nowych metod selektywnych modyfikacji tych tetrapiroli.

Niniejszy przegląd literatury ograniczony jest do pochodnych naturalnych porfirynoidów, które znalazły lub mogą znaleźć zastosowanie w medycynie.

#### 2.1. Porfirynoidy występujące w naturze

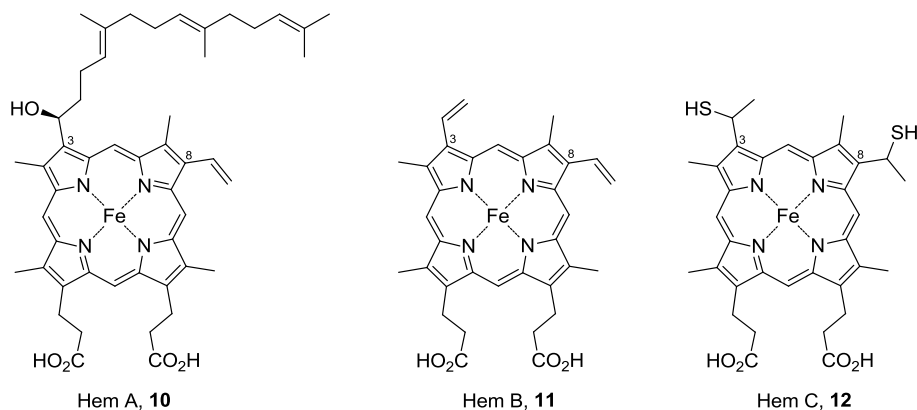
Związki tetrapirolowe odgrywają w naturze istotną rolę. Bez nich niemożliwa byłaby fotosynteza u roślin (chlorofile), czy transport tlenu w organizmach ssaków (hemy). To właśnie te porfirynoidy są najbardziej rozpowszechnione w naturze.



Rysunek 4. Struktury niektórych chlorofilu i bakteriochlorofilu *a*.

Chlorofile i bakteriochlorofile (Rysunek 4) są związkami o bardzo podobnych strukturach opartych na szkielecie chloryny lub bakteriochloryny. Chlorofile są chlorynami, posiadającymi w luce makrocyklicznej skompleksowany jon  $\text{Mg}^{2+}$ . Charakterystycznym elementem ich struktury jest obecność grupy estrowej w pozycji 17, najczęściej jest to pochodna fitolu. Chlorofile dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. Posiadają jeden z największych współczynników ekstynkcji molowej rzędu  $10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Ponadto, wykazują silną fluorescencję. Odpowiedzialne są za zielony kolor roślin, a ich rola biologiczna w bardzo dużym uproszczeniu polega na przemianie energii świetlnej w chemiczną. Z kolei bakteriochlorofile swoją nazwę zawdzięczają pochodzeniu – odkryto je w bakteriiach przeprowadzających fotosyntezę.

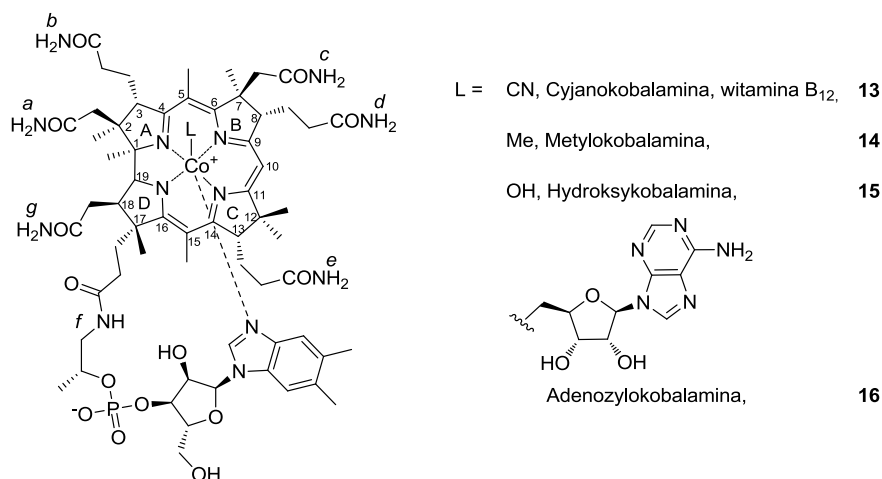
U ssaków porfiryny odgrywają istotną rolę w procesie oddychania. Hem uczestniczy w transporcie tlenu do wszystkich komórek organizmu (Rysunek 5). Jest również grupą prostetyczną wielu enzymów. Występuje między innymi w hemoglobinie, mioglobinie i cytochromach. Struktura hemów oparta jest na szkielecie protoporfiryny IX (PPIX).



Rysunek 5. Struktury niektórych hemów.

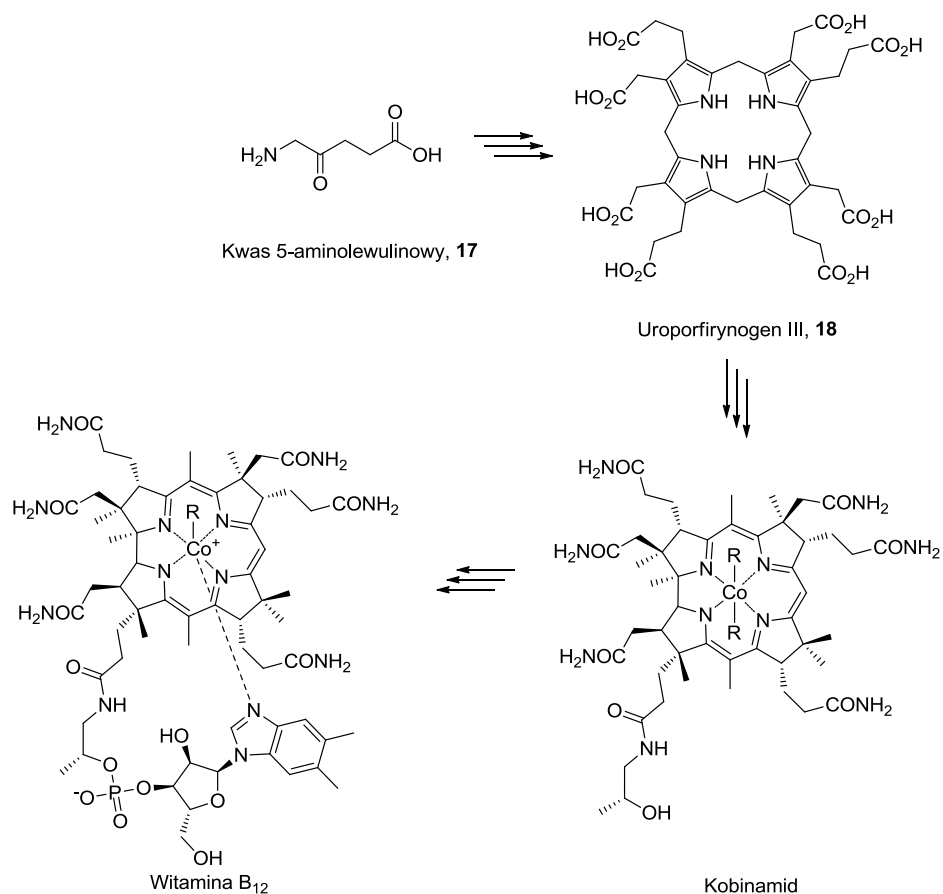
Najbardziej rozpowszechniony jest hem B, czyli kompleks żelaza(II) i protoporfiryny IX. Pozostałe analogi różnią się rodzajem podstawników w pozycjach 3 i 8 na zewnątrz pierścienia tetrapirolowego. Produktem rozkładu hemu jest bilirubina – liniowy tetrapiroł o pomarańczowej barwie. Związek ten wydalany jest z organizmu z żółcią, a jego nagromadzenie w organizmie powoduje żółte zabarwienie oczu oraz skóry (tzw. żółtaczkę) i najczęściej świadczy o nieprawidłowym funkcjonowaniu wątroby.

W naturze hem i chlorofil, są najczęściej spotykanymi porfirynoidami. Istnieją jednak tetrapirole, które występują w naturze w znacznie mniejszej ilości, a mimo to odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu organizmów żywych. Do takich związków należy witamina B<sub>12</sub> (Rysunek 6).



Rysunek 6. Witamina B<sub>12</sub> i jej pochodne występujące w naturze.

Koryna ta jest ważnym koenzymem i bierze udział m.in. w reakcjach metylowania, czy przeniesienia grupy metylowej. Dla człowieka jest ona związkiem egzogennym, co oznacza, że musi być dostarczona w pożywieniu. Dzielne zapotrzebowanie u ludzi wynosi około 2 µg. Jej niedobór prowadzi do anemii, z drugiej strony nie odnotowano negatywnych skutków jej przedawkowania. Nazwa witamina B<sub>12</sub> obejmuje cztery pochodne kobalaminy różniące się ligandem w pozycji β. Najmocniejsze wiązanie Co–L występuje w cyjanokobalaminie **13**. Dzięki silnemu powinowactwu do anionu CN<sup>–</sup> pochodne B<sub>12</sub> wykorzystuje się jako chemosensory cyjanków oraz antidotum dla osób, które uległy zatruciu tymi solami. Ponadto witamina B<sub>12</sub> jest dodatkiem stosowanym w przemyśle spożywczym. Produkuje się ją przy użyciu bakterii,<sup>14</sup> a biosynteza obejmuje ponad 30 reakcji enzymatycznych. Jednym z ważniejszych związków pośrednich w biosyntezie witaminy B<sub>12</sub> jest kobinamid **1** (Schemat 1).<sup>15</sup>

Schemat 1. Biosynteza witaminy B<sub>12</sub>.

## 2.2. Chemosensory i antidota cyjanków

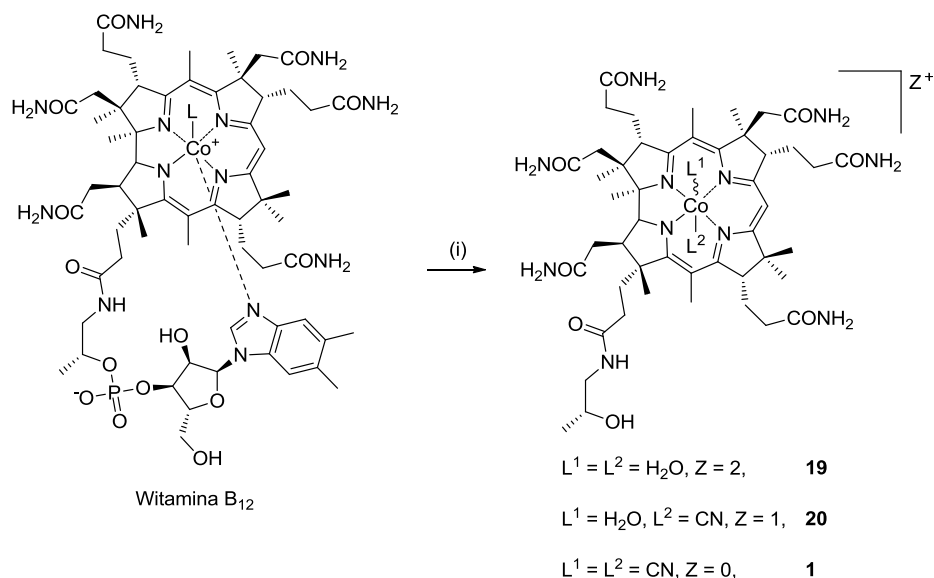
Cyjanowodor (zwyczajowo nazywany kwasem pruskim) to niskowrząca ciecz (t. w. 27 °C) o charakterystycznym zapachu gorzkich migdałów. Jest bardzo silną trucizną, ponieważ anion cyjankowy (podobnie jak siarkowodorowy, azydkiowy czy tlenek węgla) wiąże się trwale z oksydazą cytochromu *c*, upośledzając funkcje oddychania komórkowego.<sup>16</sup> Około 3 miligramów cyjanowodoru na kilogram masy ciała, uznaje się za dawkę śmiertelną,<sup>17,18</sup> a w przypadku zatrucia drogą wziewną stężenie 270 ppm powoduje praktycznie natychmiastową śmierć.<sup>19</sup> Stosunkowo duże ilości cyjanowodoru wytwarzane są w trakcie pożarów, zwłaszcza z płonących polimerów zawierających atomy azotu takich jak: poliamidy czy poliuretany, powszechnie stosowane w produkcji mebli.<sup>20</sup> W trakcie II Wojny Światowej Niemcy używali Cyklonu B (kwasu pruskiego osadzonego na ziemi krzemkowej) w komorach gazowych obozów zagłady. Obecnie np. w Czechach nadal produkuje się odpowiednik Cyklonu B pod nazwą URAGAN D2 jako środek dezynfekujący. Choć cyjanowodor jest bardzo toksyczny, to występuje on również w naturze, w postaci glikozydów, na przykład: w pestkach niektórych owoców (moreli, wiśni, jabłek), migdałach czy manioku jadalnym. Szczególnie dużym problemem jest występowanie cyjanków

w manioku. Roślina ta jest podstawowym źródłem węglowodanów dla około 500 milionów ludzi zasiedlających pas tropikalny.<sup>21</sup> Spożywanie manioku w formie surowej jest niemożliwe, gdyż zawartość, pochodzącego z glikozydów, cyjanku sięga nawet kilkuset miligramów na kilogram.<sup>18</sup> Cyjanek zwykle usuwa się z manioku poprzez wielokrotne płukanie wodą, jednakże zawsze pozostaje w nim pewna jego ilość. Spożycie nieumiejętnie przetworzonego manioku może doprowadzić do zatrucia, a nawet śmierci. Z powodu zatruc wywołanych przez nieprawidłowo przygotowane posiłki, cierpi przynajmniej 200 tysięcy ludzi rocznie,<sup>22</sup> dlatego też poszukuje się szybkich, tanich, selektywnych i możliwie czułych metod wykrywania cyjanków, jak również antidotów stosowanych w zatruciach cyjankami. Znacząca ilość danych literaturowych świadczy o tym, że nieustannie trwają badania nad nowymi, efektywniejszymi sposobami wykrywania tych jonów.<sup>13,23-25</sup>

### 2.2.1. Pochodne kobalaminy, jako antidota w zatruciach cyjankami

Witamina B<sub>12</sub> w swojej strukturze posiada atom kobaltu, wykazujący bardzo duże i selektywne powinowactwo do anionu cyjankowego. Stała trwałości tego kompleksu jest wysoka i wynosi  $2.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ . Właściwość tą wykorzystuje się w leczeniu zatruc cyjankami, podając dożylnie witaminę B<sub>12</sub> w postaci hydroksykobalaminy **15**. Powinowactwo anionu CN<sup>-</sup> do Co w kobinamidzie jest jednak znacznie większe i wynosi  $1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Na tej podstawie Boss i współpracownicy zaproponowali użycie diakwakobinamidu **19**, jako antidotum w zatruciach cyjankami.<sup>7</sup>

Kobinamid otrzymuje się z witaminy B<sub>12</sub> w wyniku hydrolizy fosforanu w pozycji *f*-witaminy B<sub>12</sub> (Schemat 2). Opracowano kilka sposobów prowadzenia tego procesu. Boss ogrzewał witaminę B<sub>12</sub> z kwasem solnym.<sup>26</sup> Szybka reakcja (8 min.) w temperaturze 65 °C dała kobinamid w postaci diakwakompleksu z wydajnością powyżej 80%. Z kolei Renz wykorzystał do tego celu świeżo strącony Ce(OH)<sub>3</sub> oraz HCN.<sup>27,28</sup> W warunkach tych dicyjanokobinamid (**1**) tworzył się z wydajnością 95%. Zelder otrzymał akwakobinamid **20** w reakcji witaminy B<sub>12</sub> z Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O w metanolu, w tubie ciśnieniowej, przegrzewając rozpuszczalnik do 100 °C przez 20 min (63%). Następnie, przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) rozdzielił mieszaninę regioizomerów akwakobinamidu **20** otrzymując α-cyjano-β-akwakobinamid (40%) oraz α-akwa-β-cyjanokobinamid (23%). Kompleks dicyjankowy **1** można łatwo przekształcić w akwakompleks **20** w reakcji z kwasem octowym.<sup>29,30</sup>

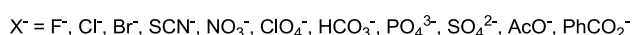
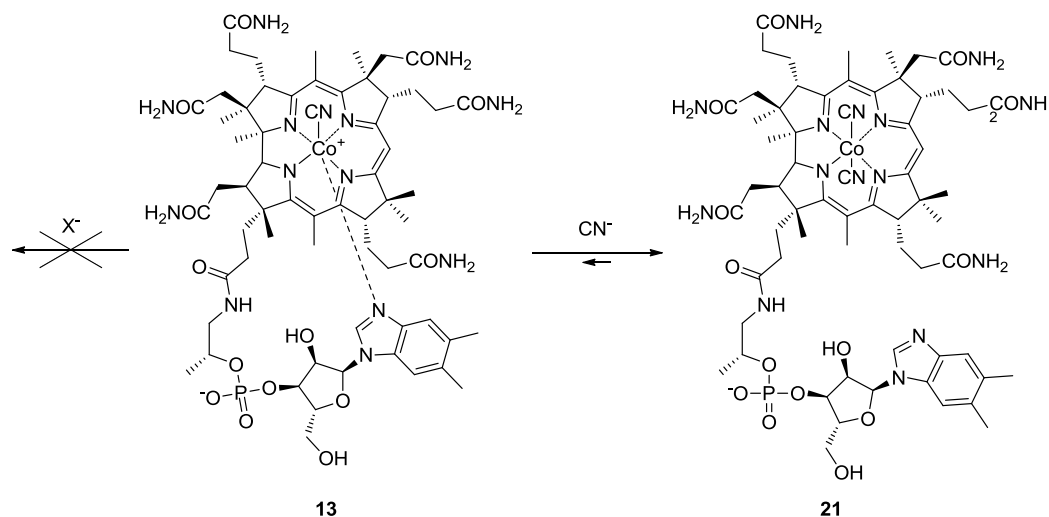


Schemat 2. Synteza: (A) diakwakobinamidu **19**: (i) L = OH, HCl, 65 °C, 8 min. 80%; (B) akwakobinamidu **20**: (i) L = CN lub OH, 1) Ce(OH)<sub>3</sub>, HCN, 95%. 2) AcOH, 24 godz. albo L = CN, (i) Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3(H<sub>2</sub>O), MeOH, 100 °C, 20 min., 63%.

W toku dalszych badań Boss i współpracownicy wykazali skuteczność diakwakobinamidu **19** w leczeniu zatruc cyjankami, prowadząc badania na liniach komórkowych a następnie muszkach owocowych oraz myszach.<sup>31</sup> Badania antidotów na modelach zwierzęcych prowadzi się pośrednio, mierząc spektroskopowo stężenia oksy- i deoksyhemoglobiny. Zatrucie cyjankami prowadzi do wzrostu stężenia oksyhemoglobiny i spadku stężenia deoksyhemoglobiny. Na tej podstawie dokonano porównania skuteczności odtruwania przez kobinamid i hydroksykobalaminę (którą obecnie stosuje się jako odtrutkę).<sup>32</sup> Badania, które przeprowadzono na nowozelandzkich królikach, wykazały że użycie kobinamidu jako antidotum ponad pięciokrotnie skraca czas powrotu ilości oksy- i deoksyhemoglobiny do normalnych wartości stężeń.

### 2.2.2. Pochodne kobalaminy, jako chemosensory anionu cyjankowego

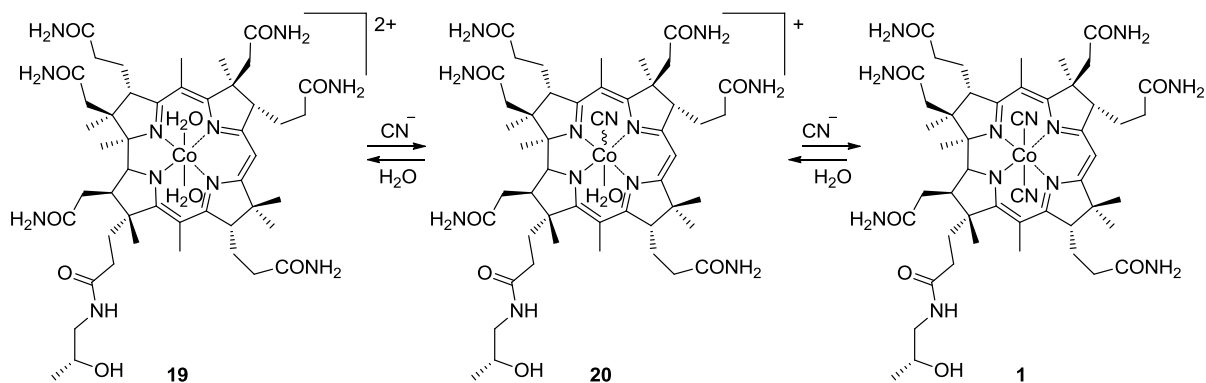
Drugim zastosowaniem witaminy B<sub>12</sub> i jej pochodnych jest detekcja anionów CN<sup>-</sup>. W roku 2008 Zelder opisał metodę oznaczania jonów CN<sup>-</sup>, w której witamina B<sub>12</sub> pełniła rolę chemosensora.<sup>33</sup> Aniony cyjankowe ze względu na silne powinowactwo do atomu kobaltu witaminy B<sub>12</sub>, zdolne są do wymiany liganda benzimidazolowego, tworząc dicyjanokompleks **21** (Schemat 3). Powoduje to bathochromowe przesunięcie pasm absorpcji w widmie UV/Vis kompleksu **21** w porównaniu do pasm absorpcji witaminy B<sub>12</sub>, dlatego też obserwuje się zmianę koloru z czerwonego na fioletowy. Niestety, metoda ta choć bardzo selektywna (nie zaobserwowano zmian koloru gdy stosowano inne aniony), pozwala na spektroskopowe oznaczenie anionów cyjankowych tylko w milimolowych stężeniach.



Schemat 3. Witamina B<sub>12</sub> jako chemosensor CN<sup>-</sup>.

Znacznie lepszymi chemosensorami anionów CN<sup>-</sup> są akwakompleksy pochodnych witaminy B<sub>12</sub>. Detekcja cyjanków z wykorzystaniem pochodnych witaminy B<sub>12</sub>, możliwa jest dzięki znacznej różnicy w położeniu pasm absorpcji w widmie UV/Vis akwakompleksu i kompleksu dicyjano. Akwakompleksy mają kolor pomarańczowy, który w obecności anionów CN<sup>-</sup> zmienia się na intensywnie fioletowy. Dzięki wysokim współczynnikom ekstynkcji pochodnych witaminy B<sub>12</sub>, można obserwować zmianę koloru bardzo rozcieńczonych roztworów, zatem metoda ta jest bardzo czuła. Ponadto, w przypadku pochodnych witaminy B<sub>12</sub> atom kobaltu koordynuje anion CN<sup>-</sup> bardzo selektywnie.

Kobinamid posiada jedną z najwyższych wartości stałych kompleksowania anionu CN<sup>-</sup>, stąd jest on znacznie lepszym receptorem anionów CN<sup>-</sup> niż witamina B<sub>12</sub>. Do wykrywania cyjanków stosuje się zarówno akwakobinamid **20** jak i diakwakobinamid **19**.<sup>34</sup> Ten ostatni w obecności niedomiaru anionów cyjankowych, bardzo szybko przekształca się w dicyjanokobinamid **1** w warunkach kontroli kinetycznej (Schemat 4). Po pewnym czasie ustala się równowaga odpowiednia dla danego stężenia anionów CN<sup>-</sup>, w której znaczący

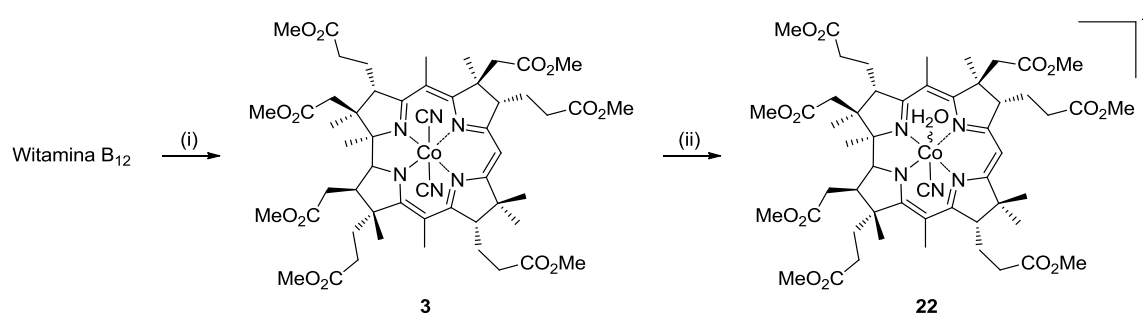


Schemat 4. Równowaga ligandów w chemoreceptorach cyjanków opartych na pochodnych witaminy B<sub>12</sub>.

udział ma akwakobinamid **20**. W związku z większą trwałością pochodnej **20** (stabilna przez długi czas w temperaturze 4 °C) w stosunku do diakwakobinamidu **19**, wygodniej jest stosować do detekcji cyjanków ten pierwszy.

Wykorzystując związek **20** Boss opracował spektroskopową metodę ilościowego oznaczania cyjanku we krwi,<sup>28</sup> limit wykrywalności wynosi około  $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Niestety, metoda ta wymaga skomplikowanej procedury analitycznej. Krew należy odwirować, cyjanek z krwinek wylugować wodą, a następnie przeprowadzić go w cyjanowodór. Po zateżeniu, próbka poddawana jest reakcji z chemosensorem i następnie analizie spektroskopowej.

Ester metylowy kwasu kobyrynowego **3** posiada bardzo wysoką wartość stałej kompleksowania  $\text{CN}^-$  i wynosi ona  $1.35\times 10^6\text{ M}^{-1}$ . Niestety, ograniczeniem w jego stosowaniu jest słaba rozpuszczalność tego związku w wodzie.



Schemat 5. Synteza heptaestru metylowego **3** i jego akwakompleksu. (i) MeOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 7 dni, 89%; (ii) 30% HClO<sub>4</sub> lub 100% AcOH.

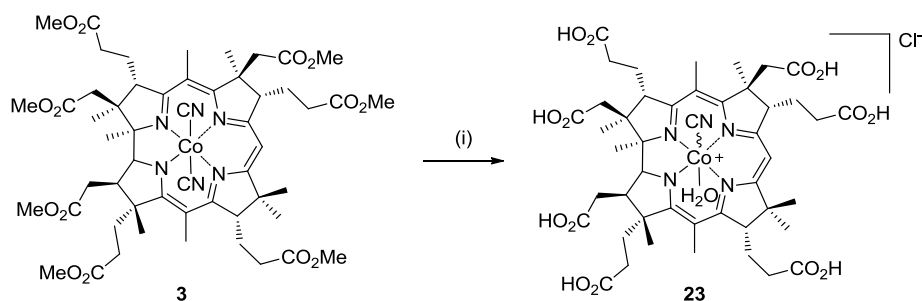
Syntezę heptaestru metylowego opisał w swej dysertacji Werthemann (Schemat 5).<sup>35</sup> Witamina B<sub>12</sub> potraktowana jednonormalnym roztworem kwasu siarkowego w metanolu ulega hydrolizie, a następnie estryfikacji (89%). Ester **3** przekształcono w akwakompleks **22** w reakcji z wodnym 30%-owym roztworem kwasu nadchlorowego, związek ten istnieje w postaci dwóch regioizomerów (co wynika z możliwości wymiany liganda od strony  $\alpha$ - lub  $\beta$ -), które pozostają ze sobą w równowadze.<sup>36</sup>

Zelder i współpracownicy użyli estru metylowego kwasu kobyrynowego do detekcji cyjanków w manioku.<sup>22,37,38</sup> Heptaester **22** osadzono na żelu krzemionkowym C<sub>18</sub>, a następnie w tej formie użyto go jako immobilizowany wskaźnik do oznaczania cyjanków. W ten sposób otrzymano proste i czułe urządzenie wielokrotnego użytku (regenerowane poprzez przepłukanie 1% wodnym roztworem kwasu, a następnie wodą). Wskaźnik ten przetestowano na próbkach ekstraktów z manioku oraz dymu tytoniowego. Następnie, tą samą techniką użyto do bezpośredniej detekcji anionów  $\text{CN}^-$  we krwi.<sup>39</sup> Metoda ta pozwala, bez konieczności używania sprzętu laboratoryjnego, na szybką ocenę zawartości szkodliwej ilości  $\text{CN}^-$ .



Hassan, Hamza i Kelany wykorzystali heptaester **3** do ilościowego oznaczania cyjanków w ściekach metodą spektroskopową.<sup>40</sup> W tym przypadku, możliwe było oznaczenie stężeń anionów  $\text{CN}^-$  poniżej  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Pomiar uznawano za zakłócony, gdy absorbancja dla wybranych długości fal (353, 368 i 580 nm) zmieniała się o  $\pm 5\%$ . Najniższą selektywność kompleksowania zaobserwowano w obecności anionów  $\text{SO}_3^{2-}$ . Zmianę absorbancji (580 nm) o 5% zaobserwowano, gdy stosunek anionów  $\text{SO}_3^{2-}/\text{CN}^-$  wynosił 75. Autorzy wykazali użyteczność tej metody do oznaczania zawartości cyjanków w ściekach przemysłowych z dokładnością do 95%. Na końcu porównali oni swoją metodę z innymi dotychczas opisanymi w literaturze. Co prawda, istnieje kilka metod dokładniejszych i bardziej selektywnych, ale wymagają one dłuższego czasu oznaczenia. Większość metod jest mniej selektywna, z kolei limity detekcji są na podobnym poziomie do metody wykorzystującej heptaester **3**.

Znacznie lepszym podejściem wydaje się zastosowanie w roli chemosensora rozpuszczalnego w wodzie kwasu kobyrinowego **23**. Otrzymuje się go w reakcji zasadowej hydrolizy heptaestru metylowego **3** (79%) (Schemat 6).<sup>41</sup> Stała kompleksowania anionu  $\text{CN}^-$  kwasem kobyrinowym **23** jest mniejsza od tej wyznaczonej dla reakcji z kobinamidem i wynosi  $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Mimo to, jest to wartość wystarczająco duża, aby można było skutecznie oznaczać aniony  $\text{CN}^-$  w roztworach wodnych.



Schemat 6. Synteza kwasu kobyrinowego. (i) NaOH, MeOH, 24 godz., 79%.

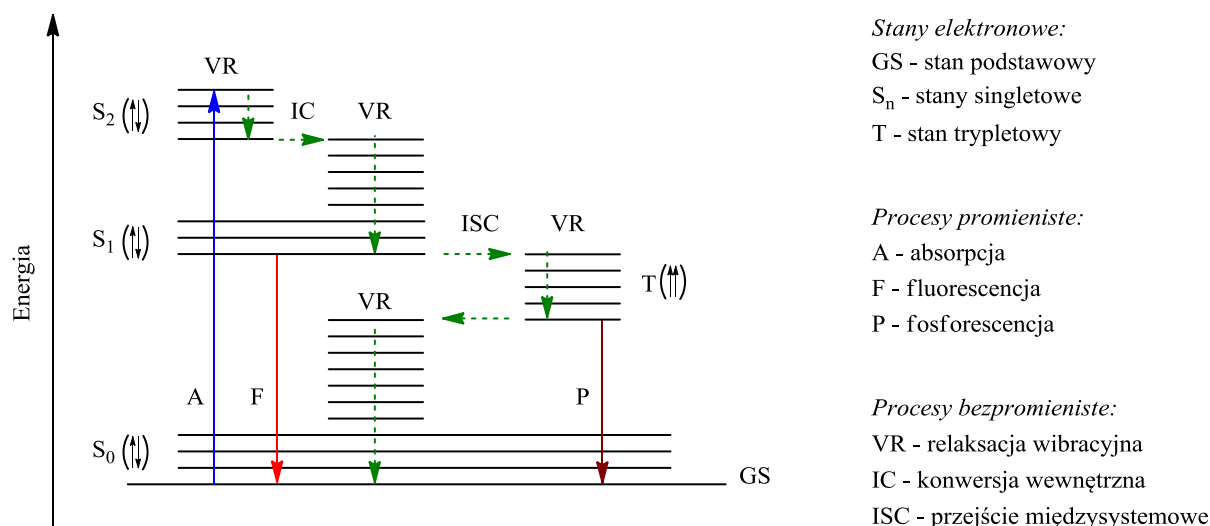
Zelder i Männel-Croisé porównali właściwości kompleksujące opisanych powyżej akwakompleksów: kwasu kobyrinowego **23**, heptaestru **22** i kobinamidu **20**.<sup>42</sup> Autorzy stwierdzili, że selektywność detekcji anionów  $\text{CN}^-$  względem  $\text{SCN}^-$  kwasem kobyrinowym **23** jest około dziesięciokrotnie większa niż w przypadku zastosowania kobinamidu **20** czy heptaestru **22**. Lepsza selektywność detekcji  $\text{CN}^-$  kwasem kobyrinowym **23** wynika z wewnątrzcząsteczkowego oddziaływania grupy karboksylowej w pozycji *c*- z aksjalnym ligandem – cząsteczką wody. Kwas kobyrinowy pozwala na bezpośrednią detekcję cyjanków poprzez obserwację zmiany barwy wodnych roztworów ( $10 \mu\text{M}$ ).

Obecnie do wykrywania cyjanków stosuje się metodę wymagającą destylacyjnego wydzielenia cyjanku w postaci HCN, przereagowaniu z chloraminą-T oraz kwasami 1,3-dimetylobarbiturowym i pirydino-4-karboksylowym, a następnie zmierzeniu absorbancji (600 nm). Metoda ta jest czuła (zakres pomiarowy 0.02 - 20 µg/L) i dokładna, ale wymaga skomplikowanej procedury. Z kolei akwakompleksy pochodnych witaminy B<sub>12</sub> pozwalają na selektywne i szybkie określenie niebezpiecznej dawki cyjanków (0.02 mg/mL). W przypadku leczenia zatruc cyjankami najistotniejszy jest czas, dlatego maksymalne skrócenie czasu oczekiwania na wynik jest niezwykle istotne w przypadkach bezpośredniego zagrożenia życia. Wdrożenie procedur detekcyjnych opartych na akwakompleksach pochodnych witaminy B<sub>12</sub> w lecznictwie jest więc bardzo atrakcyjnym kierunkiem i może stanowić bardzo dobrą alternatywę lub uzupełnienie obecnie stosowanych metod.

### **2.3. Terapia fotodynamiczna**

Historia terapii fotodynamicznej sięga bardzo zamierzchłych czasów, kiedy to starożytni Grecy i Indianie używali słońca do leczenia niektórych schorzeń skóry.<sup>43,44</sup> Jednakże pierwsze, nowożytne doniesienie na temat leczenia nowotworu skóry światłem miało miejsce na początku XX wieku i zostało opisane przez von Tappeinera i Jesionka.<sup>45</sup> Termin terapia fotodynamiczna został użyty po raz pierwszy w 1907 roku przez von Tappeinera do określenia dynamicznej interakcji światła ze związkiem fotoczułym i tlenem, która prowadzi do zniszczenia tkanki chorobowej.<sup>46</sup>

Początkowo fototerapię stosowano wyłącznie do leczenia chorób nowotworowych, obecnie ma ona nieco szersze zastosowanie. Ze względu na zasadę działania próbuje się ją wdrażać w leczeniu chorób o podłożu bakteryjnym, wirusowym i grzybiczym. Ważne jest aby fotouczulacze selektywnie wnikały do komórek nowotworów i patogenów. Następnie, zmienione chorobowo miejsce zostaje poddane działaniu światła o określonej długości fali w zależności od stosowanego fotouczulacza. Związek ten absorbuje światło i ulega wzbudzeniu, przechodząc ze stanu singletowego podstawowego w singletowy stan wzbudzony (Rysunek 7). Następnie, cząsteczka fotouczulacza może przejść do niżej leżącego stanu trypletowego. W obecności tlenu może nastąpić międzycząsteczkowy transfer energii i wówczas generowany jest tlen singletowy (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Tlen w stanie S<sub>1</sub> jest bardzo reaktywny i wewnątrz komórek reaguje z biomolekułami, często powodując ich degradację.



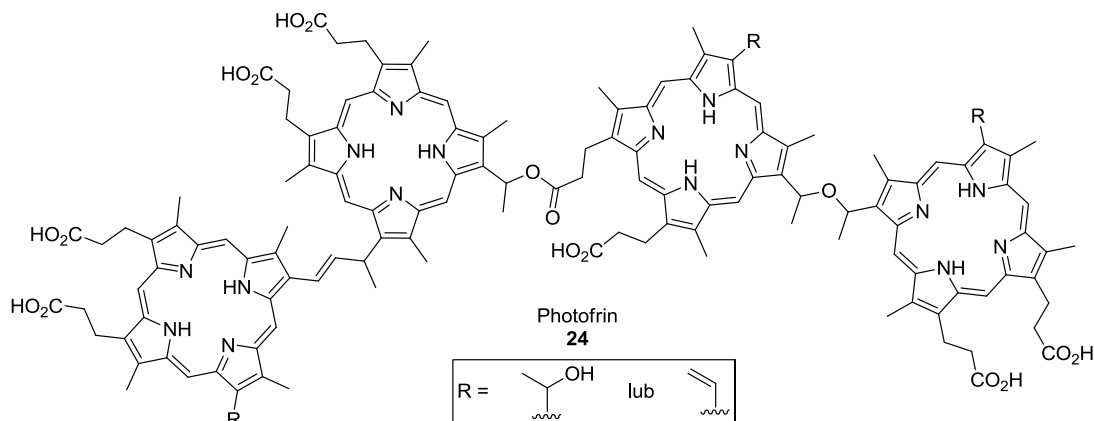
Rysunek 7. Diagram Jabłońskiego.

Elementem kluczowym w skutecznej terapii fotodynamicznej jest fotouczulacz. Najważniejsze cechy, jakie musi posiadać to duża biodostępność, stabilność w warunkach fizjologicznych, selektywna akumulacja w komórkach nowotworowych, wysoka wydajność generowania tlenu singletowego oraz odpowiednie właściwości fotofizyczne – wysoki współczynnik ekstynkcji molowej, absorpcja w zakresie tzw. okienka biologicznego. Przyjmuje się, że najlepiej jeśli absorbuje on światło o długości fali od ~700 do 1000 nm. Światło o takiej długości fali skutecznie wnika w głąb tkanki, co najmniej na głębokość 1 centymetra.<sup>47</sup> Największym problemem jest selektywność gromadzenia się fotouczulacza w komórkach nowotworowych i patogenach

Biodostępność fotouczulaczy może zostać zwiększona, w wyniku modyfikacji prowadzących do poprawy rozpuszczalności tych związków w wodzie. Jedną z nich jest wprowadzenie do struktury cząsteczki jednostek poliglikolu lub cukru. Obecność tych ostatnich wpływa również na selektywność kumulowania się fotouczulacza w komórkach nowotworowych.

Związki tetrapirolowe spełniają większość kryteriów dotyczących właściwości biologicznych i fotofizycznych stawianych dobrym fotouczulaczom i dlatego są najpopularniejszą klasą związków stosowaną w terapii fotodynamicznej. Wśród nich największe zastosowanie znalazły związki naturalne lub ich pochodne i to one były pierwszymi pochodnymi zastosowanymi w praktyce medycznej. Obecnie wyróżnia się trzy generacje fotouczulaczy.

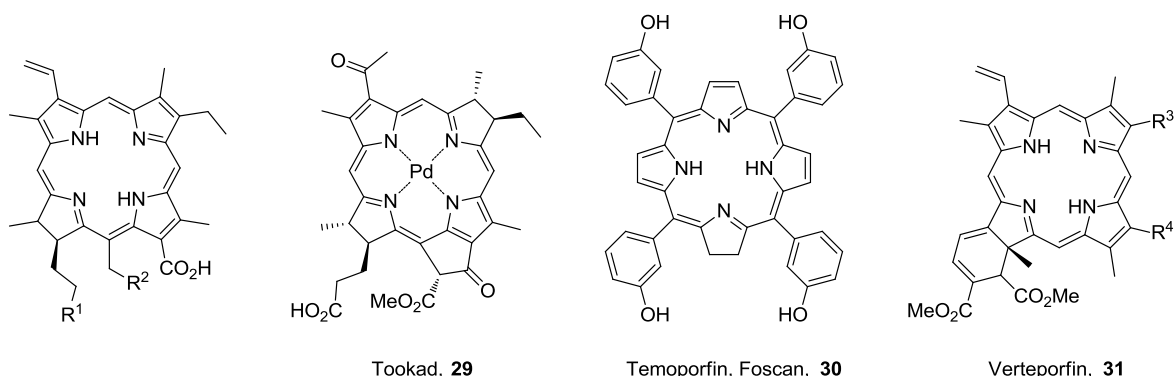
Fotouczulacze pierwszej generacji, są to pierwsze fotouczulacze porfiryne używane w terapii fotodynamicznej. Otrzymywanie ich opisali Dolphin i współpracownicy.<sup>48</sup> Najszerzej stosowanym fotouczulaczem pierwszej generacji jest Photofrin<sup>®</sup> (Rysunek 8). Jest



Rysunek 8. Struktura reprezentująca Photofrin. Przedstawiono przykładowe wiązania, które łączą poszczególne jednostki porfiry. Ilość jednostek porfiryńowych może wahać się od 2 do 9

to statystyczna mieszanina oligomerów hematoporfiryny (2-9 jednostek porfiryńowych połączonych ze sobą w różny sposób) otrzymywana w wyniku jej kondensacji w warunkach zasadowych. Photofrin posiada sporo wad, które cechują fotouczulacze pierwszej generacji. Do ich wzbudzenia używa się światła o długości fali 630 nm, zatem leczenie głębszych partii tkanek jest prawie niemożliwe. Wysokie stężenie Photofrinu<sup>®</sup> długo utrzymuje się w niektórych organach i w skórze, stąd po podaniu leku pacjenci zmuszeni są unikać światła przez okres od 1 do 2 miesięcy.<sup>49</sup> Mimo wielu wad, Photofrin został zatwierdzony do leczenia m.in. raka skóry, przełyku, płuc czy dysplazji szyjki macicy.<sup>50</sup>

Zasadniczą różnicą pomiędzy pierwszą i drugą generacją fotouczulaczy jest długość fali światła absorbowanego (>660 nm), dzięki czemu są one skuteczniejsze w leczeniu tkanek położonych na większej głębokości. Właściwość tą osiąga się m.in. dzięki zastosowaniu jako rdzenia fotouczulacza chloryny lub bakteriochloryny, które względem porfiryń, posiadają pasma absorpcji przesunięte w stronę dłuższych fal (odpowiednio około 660 i 760 nm).<sup>51</sup>



Ce<sub>6</sub>: R<sup>1</sup> = CO<sub>2</sub>H, R<sup>2</sup> = CO<sub>2</sub>H **25**

Npe<sub>6</sub>: R<sup>1</sup> = CO<sub>2</sub>H, R<sup>2</sup> = CONHCH(CO<sub>2</sub>H)CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H **26**

Radachlorin: R<sup>1</sup> = CO<sub>2</sub>Na, R<sup>2</sup> = CO<sub>2</sub>Na **27**

Photolon: R<sup>1</sup> = CO<sub>2</sub>H, R<sup>2</sup> = CO<sub>2</sub>Me **28**

R<sup>3</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me, R<sup>4</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H,

lub R<sup>4</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me, R<sup>3</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H

Rysunek 9. Przykłady fotouczulaczy drugiej generacji.

Niektóre fotouczulacze drugiej generacji (Rysunek 9), wśród nich proste pochodne chlorofilu,<sup>52</sup> stosowane są w praktyce klinicznej lub są w zaawansowanej fazie badań klinicznych takich chorób jak: nowotwory głowy, szyi, płuc, piersi, skóry, prostaty, mięsaki Kaposiego, zwyrodnienie plamki żółtej.<sup>50,53</sup> Wykazują one sporą selektywność akumulacji w komórkach nowotworowych i patogenów, wciąż jednak trwają poszukiwania pochodnych posiadających specyficzne powinowactwo do określonych typów komórek lub patogenów.

Fotouczulacze drugiej generacji sprawdziły się w praktyce klinicznej dzięki dobrym właściwościom fotofizycznym, jednakże charakteryzują się one niezadowalającą selektywnością. Z tych powodów często stanowią podstawę do dalszych badań prowadzących do fotouczulaczy trzeciej generacji. Obecnie głównym celem badań jest otrzymanie połączeń efektywnych fotouczulaczy ze związkami o wysokim powinowactwie do określonego typu komórek.

Jednym z przykładów takiego podejścia są modyfikacje dobrze poznanego leku Foscan.<sup>47</sup> Jedną z strategii polega na łączeniu związków tetrapirolowych z peptydami i białkami selektywnie oddziaływującymi z komórkami nowotworowymi. W 2011 roku opisano syntezę połączeń fotouczulaczy z przeciwciałami mającymi zwiększone powinowactwo do komórek nowotworowych.<sup>54</sup> Z kolei, synteza połączeń tetrapiroli z cukrami została wyczerpująco opisana przez Cavaleiro i współpracowników w 2007 roku.<sup>55</sup> W ten sposób otrzymano związki o zwiększonym powinowactwie do niektórych komórek nowotworowych. Poprawę selektywności gromadzenia się fotouczulacza w komórkach nowotworowych osiąga się również poprzez przyłączanie lipidów. Utworzone w ten sposób związki często mają właściwości amfifilowe, dzięki czemu łatwiej przechodzą przez błony komórkowe.<sup>56</sup>

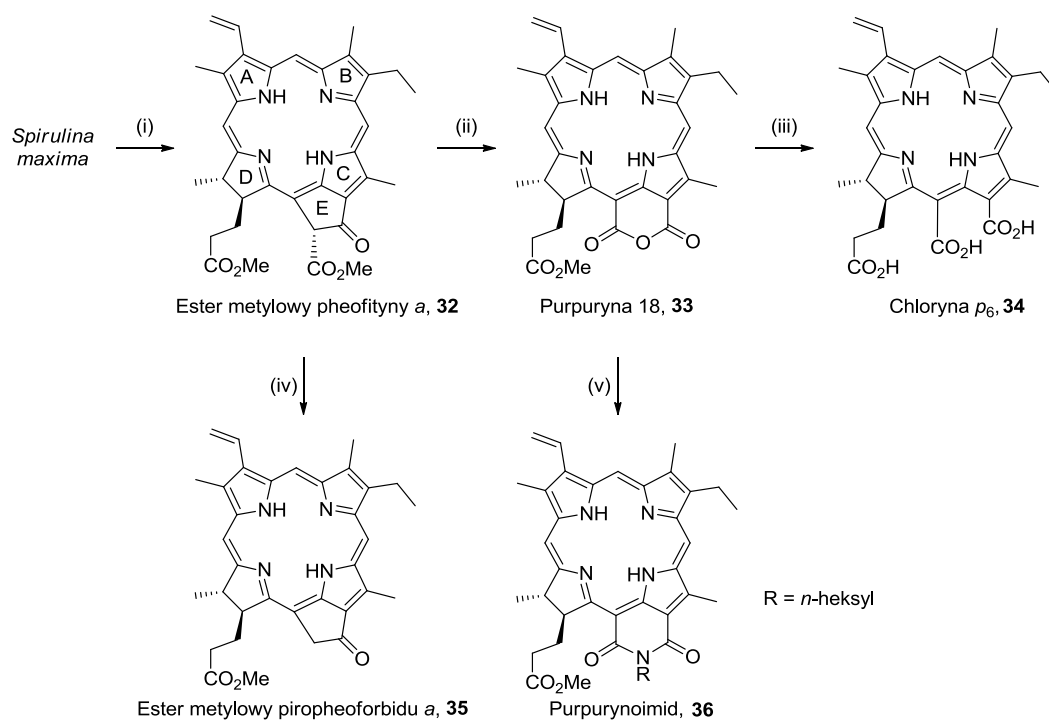
Projektowanie efektywnych fotouczulaczy jest bardzo trudne. Na obecnym etapie wiedzy, można jednak podać kilka cech jakimi powinny charakteryzować się takie związki.<sup>57</sup> Wykazano, że przesunięcie absorpcji w stronę dłuższych fal osiąga się przez zredukowanie porfiryny do chloryny lub bakteriochloryny, podstawienie dużych grup w pozycje  $\beta$ - zwiększa współczynnik ekstynkcji molowej, większą stabilność można osiągnąć zwiększając potencjał utleniania porfirynoidu np. poprzez utworzenie kompleksu z jonami  $\text{Pd}^{2+}$  lub  $\text{In}^{3+}$ . Niestety, często przeprowadzona modyfikacja w celu uzyskania jednej z pożądanych cech pogarsza inną, np. wprowadzenie do luki makrocyclicznej jonów  $\text{Pd}^{2+}$  lub  $\text{In}^{3+}$  zwiększa stabilność tetrapirołu, jednak skutkuje niższą wydajnością generowania  $^1\text{O}_2$ .

W niniejszym przeglądzie literatury opiszę modyfikacje naturalnych tetrapiroli mające na celu otrzymanie efektywnych fotouczulaczy. Najczęściej polegają one na łączeniu

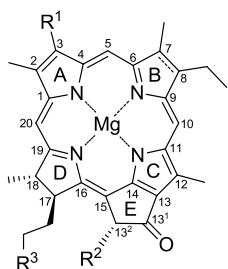
porfirynoidów ze związkami o dużym powinowactwie do komórek nowotworowych. Są to pochodne cukrów, steroli, peptydów. Z kolei, inne modyfikacje prowadzą do powstania fotouczulaczy dwufunkcyjnych – wykorzystywanych w PDT i do obrazowania nowotworów. Na końcu omówione zostaną fotouczulacze, które mają właściwości przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Połączenia tetrapiroli z peptydami oraz przeciwciałami zostały opisane w artykułach przeglądowych w roku 2011,<sup>54,58</sup> dlatego nie będę ich szczegółowo omawiał.

### 2.3.1. Modyfikacje chlorofilu i bakteriochlorofilu

Metoda izolowania chlorofilu, ich właściwości chemiczne jak i ich modyfikacje były przedmiotem licznych przeglądów.<sup>59-62</sup> Dobrym źródłem tych naturalnych tetrapiroli są sinice z rodzaju *Spirulina*. Z jednego kilograma suszu można wyodrębnić około trzech gramów chlorofilu *a*.<sup>48</sup> Ekstrakt zawiera mieszaninę chlorofilu **6-8**, w których dominuje chlorofil *a* **6**, który poddaje się demetalacji, rozdziela chromatograficznie na tlenku glinu i transestryfikuje metanolem w obecności kwasu siarkowego. W ten sposób otrzymuje się stabilną pochodną – ester metylowy pheofityny *a* **32** (Schemat 7). Pochodna ta ulega utlenieniu pod wpływem tlenu do bezwodnika **33** – purpuryny 18, który pod wpływem zasady daje trikarboksylową pochodną **34** – chlorynę *p*<sub>6</sub> (*Cp*<sub>6</sub>). Z estru metylowego pheofityny *a* **32** w wyniku pirolizy we



Schemat 7. Synteza podstawowych pochodnych chlorofilu. (i) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MeOH; (ii) O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>, następnie kwas; (iii) NaOH; (iv) 2,4,6-kolidyna, wrzenie; (v) *n*-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, KOH, MeOH.

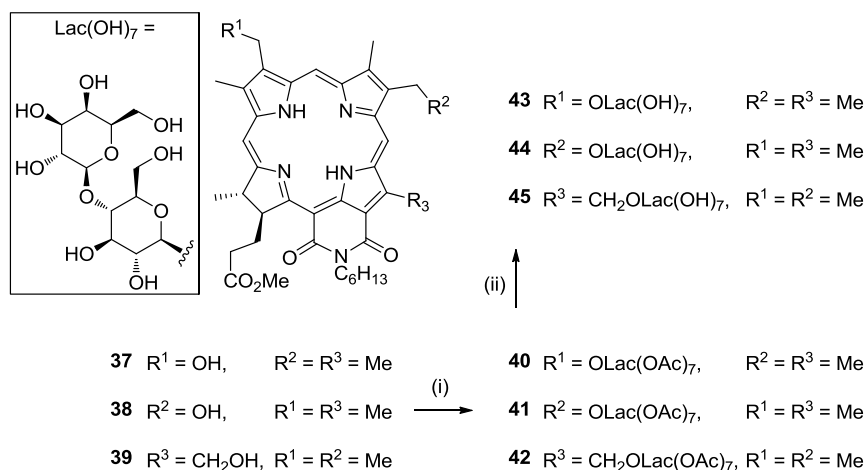


Rysunek 10. Numeracja pierścienia pochodnych chlorofilu i bakteriochlorofilu.

wrzącej 2,4,6-kolidynie otrzymuje się pochodną pirophaeoforbid **a 35** (PPFa), pochodną zdekarboksylowaną w pozycji 13<sup>2,63</sup>. Związek **33** reaguje z *n*-heksyloaminą dając odpowiedni purpurynoimid **36**.<sup>64</sup> Przedstawione powyżej syntezy obrazują podstawowe modyfikacje chlorofilu, w wyniku których otrzymuje się pochodne będące związkami wyjściowymi do dalszych funkcjonalizacji, najczęściej w pozycjach 3, 8, 13 oraz 17 (Schemat 7, Rysunek 10). Podstawowe modyfikacje grup położonych na zewnątrz pierścienia makrocyclicznego są dobrze poznane i zostały zebrane w artykule przeglądowym przez Pavlova i Ponomareva.<sup>61</sup> W niniejszym przeglądzie pochodne te będą często występowały jako materiał wyjściowy do dalszych przekształceń.

### 2.3.1.1. Połączenia pochodnych chlorofilu z cukrami

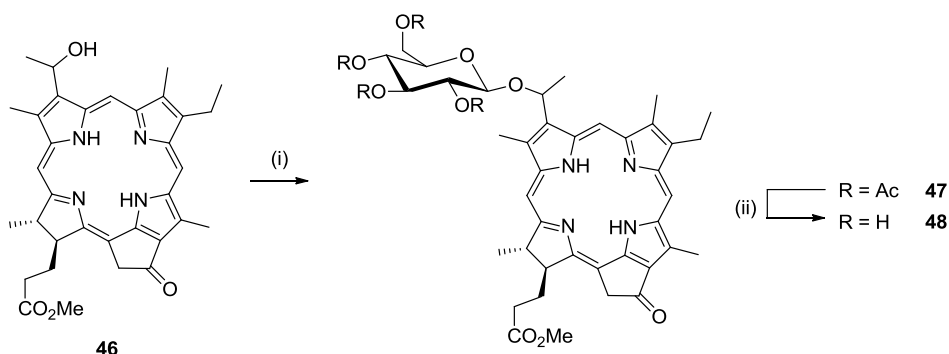
Jednym ze sposobów zwiększania biodostępności fotouczulaczy tetrapirolowych jest synteza połączeń z odpowiednimi cukrami. Ugrupowanie cukru zwiększa charakter hydrofilowy związku i ułatwia przenikanie przez błony komórkowe wyposażone w odpowiednie receptory. Wydawało się, że przyłączony stosunkowo mały fragment cukru nie będzie miał wpływu na przechodzenie cząsteczki przez błonę komórkową. W jednym z artykułów Zheng opisał tę sytuację następującą metaforą: „*will the <<mouse>> be able to drag an <<elephant>> through a mouse hole?*”<sup>65</sup> Praktyka wykazała jednak, że jest to możliwe.<sup>66,67</sup> Ponadto stwierdzono, że obecność w strukturze fotouczulacza jednostki cukrowej nie obniża wydajności kwantowej tworzenia tlenu singletowego, wpływa jednak na jego dystrybucję w komórce.<sup>68</sup> Wśród białek rozpoznających i wiążących cukry bardzo istotną grupę stanowią galektyny. Badania wykazały, że komórki nowotworowe posiadają



Schemat 8. Synteza regioizomerów purpurynoimidu **36** z laktozą. (i)  $\text{Lac(OAc)}_8$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ; (ii)  $\text{MeONa}$ .

zwiększoną ilość tych receptorów; dotyczy to najczęściej galektyny-1 (Gal-1) i galektyny-3 (Gal-3).<sup>67</sup> Galektyny te wykazują wysokie powinowactwo do  $\beta$ -galaktozydów takich cukrów jak np. laktoza.

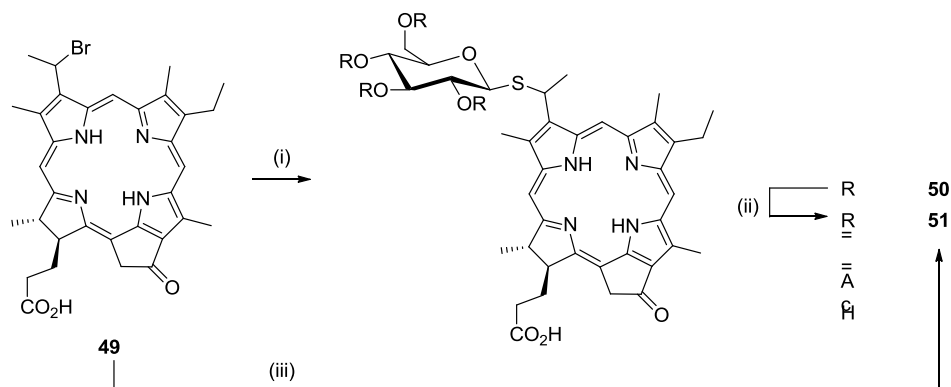
Często stosowaną metodologią prowadzącą do otrzymania połączeń cukrów z pochodnymi chlorofilu jest reakcja alkoksylowania hydroksylowych pochodnych alkoholami w obecności  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ . Pandey zastosował tę metodę do otrzymania trzech analogów purpurynoimidu **36**, różniących się miejscem przyłączenia laktozy, (pozycje 3, 8 i 12) (Schemat 8).<sup>67</sup> Alkohole **37-39** poddawane były reakcji z heptaacetylolaktozą w obecności kwasu Lewisa. Po usunięciu grup zabezpieczających otrzymano pożądane regioizomery **43-45**. Na podstawie badań *in vitro* oraz *in vivo* ustalono, że spośród przebadanych związków najbardziej efektywnym fotouczulaczem jest związek posiadający fragment laktozy w pozycji 3. Mironov w 2001 roku zastosował tą samą metodologię do otrzymania połączeń glukozy z pochodną PPFa **46** (Schemat 9).<sup>69</sup>



Schemat 9. Synteza pochodnej cukrowej **48**. (i)  $\text{Glu}(\text{OAc})_5$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ . (ii)  $\text{MeONa}$ ,  $\text{MeOH}$ .

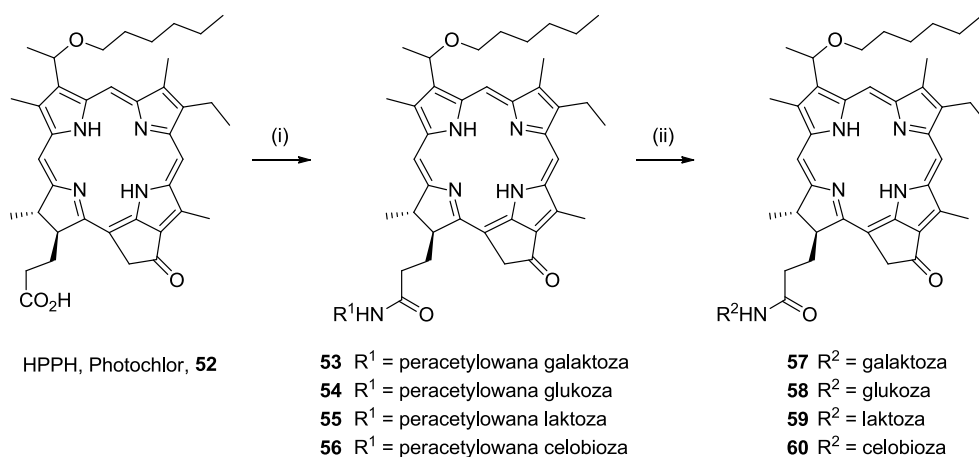
Ponadto, otrzymano połączenia glukozy z pochodną PPFa poprzez tioeter (Schemat 10). 3-(1-Bromoetylo)piropheoforbida (**49**) poddano reakcji z 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-1-tio- $\beta$ -D-glukopiranozą otrzymując acetylowaną pochodną **50**, z której po hydrolizie otrzymano tioeter **51**. W toku badań okazało się, że w reakcji tej, z powodzeniem, można zastosować pochodną heksozy z wolnymi grupami hydroksylowymi. Odbezpieczone pochodne cukrowe wykazują dobrą rozpuszczalność w wodzie, niestety nie opisano ich aktywności jako fotouczulaczy.





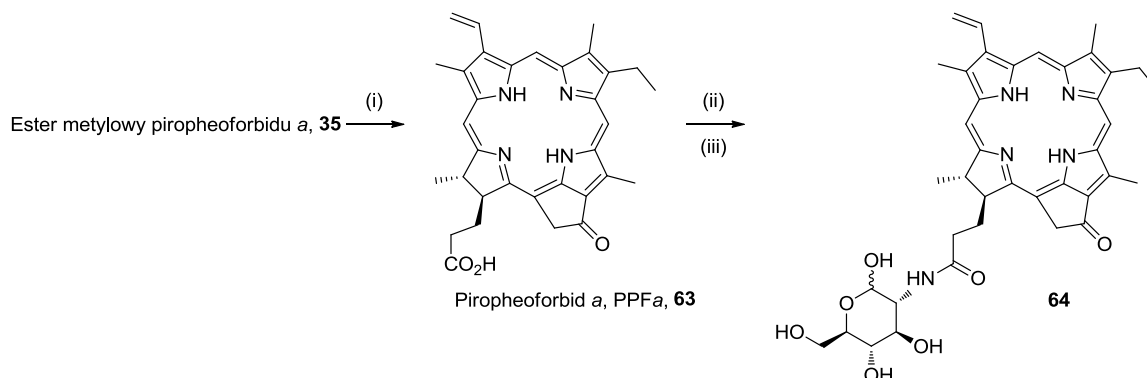
Schemat 10. Synteza tiolowych pochodnych Mironova. (i) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-tio- $\beta$ -*D*-glukopiranoza; (ii) MeONa; (iii)  $\beta$ -*D*-glukopiranozylomerkaptyd sodu, DMF.

Najbardziej popularną metodą przyłączania fragmentów cukrów do pochodnych chlorofili w pozycji 17 jest reakcja amidowania. W ten sposób Pandey ze współpracownikami zsyntetyzowali szereg pochodnych „klinicznie efektywnego”<sup>70</sup> 3-(1'-heksyloksyetylo)-3-dewinylo pirophorbidu *a* **52** (HPPH, Photochlor<sup>®</sup>) z różnymi jednostkami cukrowymi (Schemat 11).<sup>71</sup> Wolną grupę karboksylową w pozycji 17 aktywowano EDC w obecności DMAP, a następnie powstały związek pośredni poddano reakcji z acetylowanymi 1- $\beta$ -aminocukrami, zarówno mono- (galaktozą i glukozą) jak i dwucukrami (laktozą i celobiozą) (38-73%).<sup>71</sup> W ten sposób otrzymano docelowe połączenia **57-60** cukrów z HPPH w pozycji 17. Spośród przebadanych związków najbardziej efektywnym fotouczulaczem okazał się związek **57** z przyłączonym fragmentem galaktozy. Posiadał on czterokrotnie większą aktywność od wyjściowego HPPH **52**. Wykazano, że zwiększona aktywność nie wynikała jednak z lepszej akumulacji w guzie, lecz z gromadzenia się fotouczulacza w lizosomach. Równie efektywne okazało się łączenie cukrów z purpurynoimidami w pozycji 17 przy użyciu BOP jako odczynnika sprzęgającego. W ten sposób otrzymano purpurynoimidowe analogi związków **55** i **59**,<sup>67</sup> które były gorzej



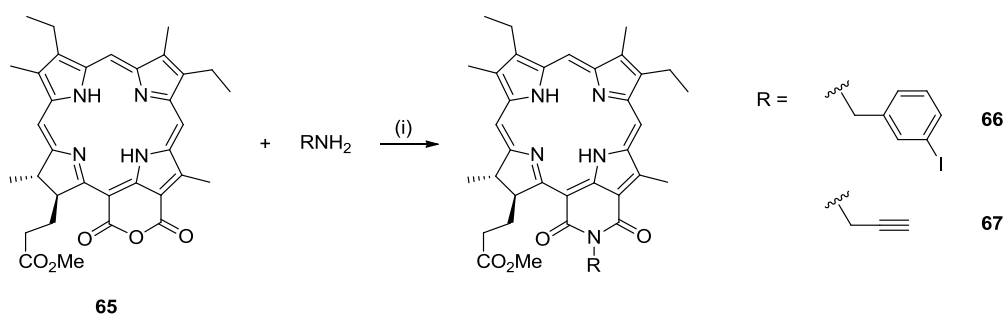
Schemat 11. Synteza połączeń cukru z HPPH. (i) EDC, DMAP, R<sup>1</sup>NH<sub>2</sub>, 38-73%; (ii) MeONa, 85-96%.





Schemat 13. Synteza pochodnej glukozy z wykorzystaniem NHS. (i) MeOH, KOH; (ii) DCC, NHS, 80%; (iii) chlorowodorek D-glukozaminy, MeONa, DMSO, 63%.

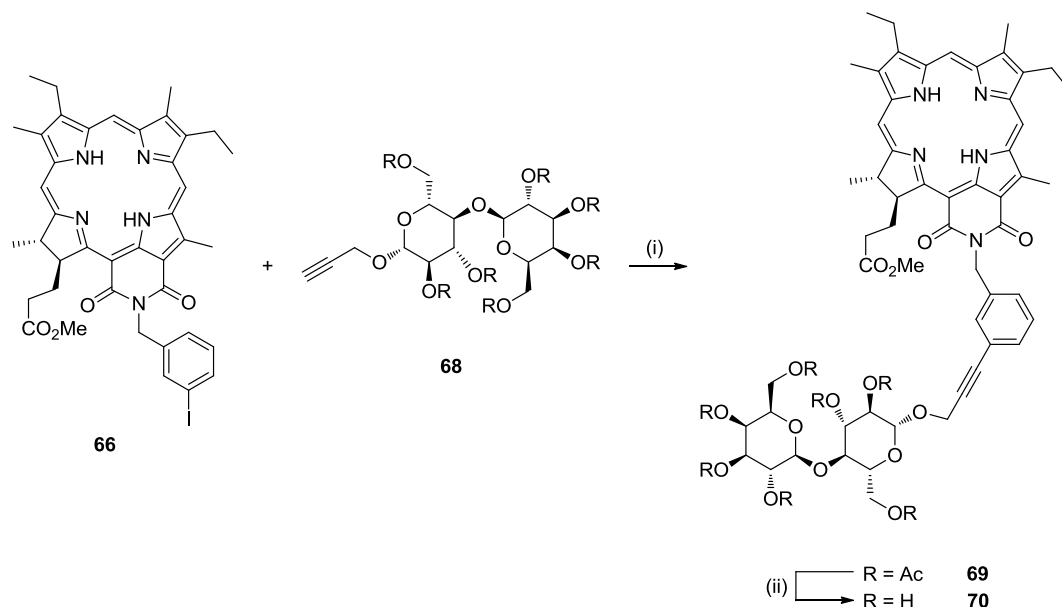
Przyłączanie podstawników w pozycji 13<sup>2</sup> pochodnych chlorofilu prowadzono dwuetapowo. Najpierw otrzymano purpurynoimidy **66** i **67** z łącznikami posiadającymi odpowiednie grupy funkcyjne, które poddano reakcjom z odpowiednimi cukrowymi blokami budulcowymi (Schemat 14).



Schemat 14. Wprowadzanie łączników w pozycję 13<sup>2</sup>. (i) benzen, wrzenie.

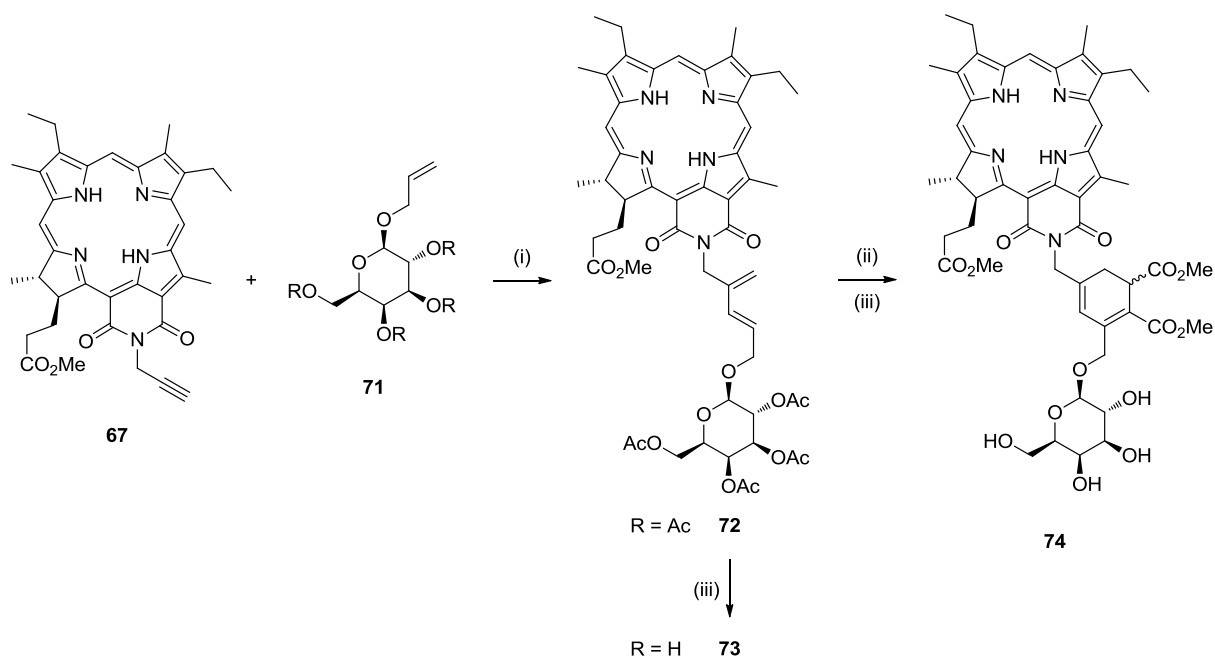
Na przykład, pochodna **66** posiadająca podstawnik jodofenyłowy reaguje z cukrem **68**, w obecności katalizatora palladowego dając pochodną **69** (Schemat 16).<sup>67</sup> Zastosowanie układu katalitycznego Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>/Ph<sub>3</sub>As umożliwiło przeprowadzenie tej reakcji bez dodatku soli miedzi, dzięki czemu wykluczono problem insercji kationu Cu<sup>2+</sup> do pierścienia makrocyclicznego.

Wyniki badań *in vitro* pochodnej **70** prowadzonej na linii komórek RIF porównywane były z innymi pochodnymi purpurynoimidów z przyłączonym ugrupowaniem laktozy w innych pozycjach.<sup>67</sup> Okazało się, że pochodna **70** wchłania się równie dobrze co wyjściowy purpurynoimid nie posiadający jednostki cukrowej. W badaniach *in vivo* pochodna ta wykazywała jednak mniejszą aktywność.



Schemat 16. Zastosowanie reakcji Sonogashiry do otrzymywania połączeń pochodnych chlorofilu i cukrów. (i)  $\text{Pd}_2\text{dba}_3/\text{Ph}_3\text{As}$ , TEA, THF, 72%; (ii) NaOH, MeOH, DCM, 80%.

Związek **67** posłużył do wprowadzenia ugrupowania cukru w reakcji metatezy enynowej (Schemat 15).<sup>72</sup> W tym celu purpurynoimid **67** poddano reakcji z 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-1-alliloksy- $\beta$ -D-galaktopiranozą w obecności katalizatora Grubbsa pierwszej generacji. Reakcja dała pożądaną produkt, ale z niską wydajnością (30%). Związek **72** poddano reakcji Dielsa-Aldera z DMAD, a następnie usunięto grupy zabezpieczające w fragmencie cukrowym otrzymując pochodną **74**. W ten sposób otrzymano analog związku **73**



Schemat 15. Wprowadzanie ugrupowania cukru w reakcji metatezy enynowej. (i) katalizator Grubbsa pierwszej generacji, DCM, 30%; (ii) DMAD; (iii) MeONa.

posiadający sztywny łącznik. Modelowanie molekularne wykazało, że utworzony w wyniku reakcji Dielsa-Aldera pierścień w pochodnej **74**, w trakcie wiązania do receptora Gal-1, zachowuje się jak mimetyk glukozy. Zastąpienie jednostki galaktozy laktozą spowodowało poprawę właściwości biologicznych. Efektywność związków **73** i **74** jako fotouczulaczy była podobna. Zatem, na efektywność terapii fotodynamicznej *in vitro* (linia komórek Molt-4), struktura łącznika pomiędzy purpurynoimidem a jednostką cukru nie miała istotnego wpływu.

Podsumowując, chlorofile z jednostkami cukrowymi są atrakcyjnym celem syntetycznym i niektóre pochodne posiadają wyraźnie zwiększone powinowactwo do receptorów Gal-1 i Gal-3. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazują, że miejsce przyłączenia jednostki cukrowej jest istotne i najlepsze wyniki otrzymano przyłączając cukier w pozycji 3. Najlepsze właściwości biologiczne posiadały pochodne z przyłączoną jednostką laktozy lub galaktozy.

### 2.3.1.2. Połączenia pochodnych chlorofilu z lipidami

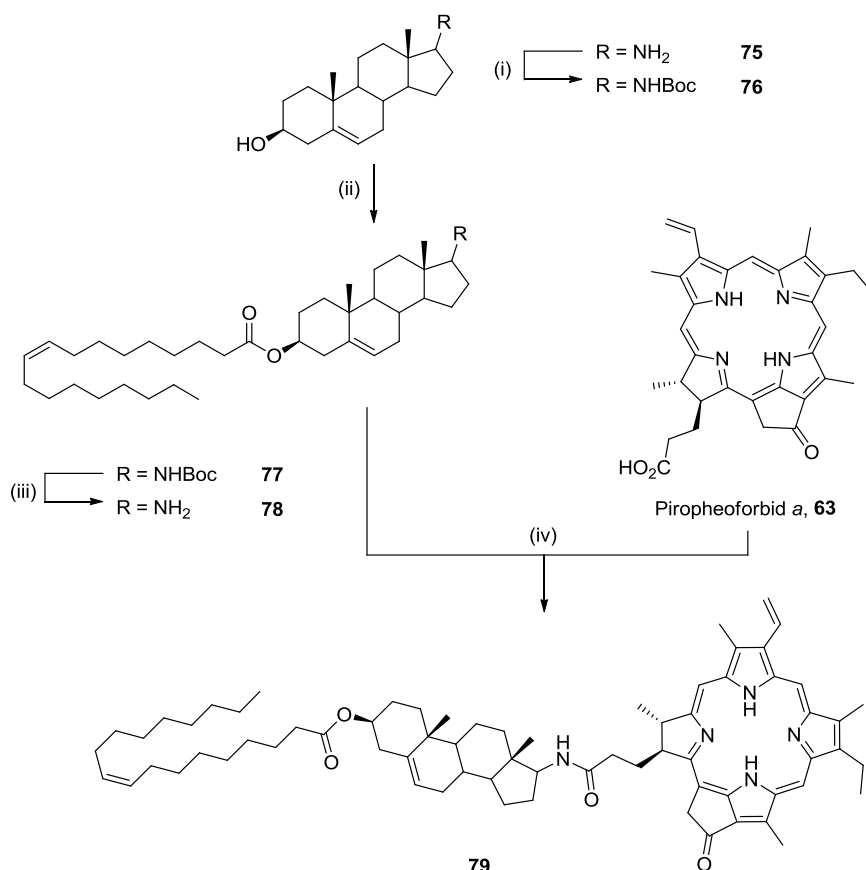
Porfirynoidy, zwłaszcza te o charakterze amfifilowym, mają zdolność do łatwego przenikania przez błony komórkowe. Jeśli pochodne takie zdolne są do utworzenia miceli lub liposomów, wówczas transport do komórek może odbywać się dzięki łączeniu się porfirynoidu z receptorami lipoprotein niskiej gęstości (LDL).<sup>56</sup> Funkcją LDL jest transport nierozpuszczalnych w wodzie związków organicznych, głównie cholesterolu, do wnętrza komórki. Z kolei, sam proces przenikania możliwy jest dzięki receptorom lipoprotein niskiej gęstości (LDLr), które zgromadzone są na powierzchni komórki. Ze względu na duże zapotrzebowanie komórek nowotworowych na lipidy potrzebne do budowy błon komórkowych, receptory LDLr na powierzchni komórek nowotworowych występują w znacznie większej liczbie niż w zdrowych komórkach. Na przykład jest ich 6 razy więcej na powierzchni komórek raka jelita grubego, niż na powierzchni zdrowych komórek jelita.<sup>73</sup> Transport fotouczulaczy do komórek nowotworowych przez LDL jest więc atrakcyjną metodą. Obecnie badane są dwie koncepcje wykorzystujące transport fotouczulaczy dzięki LDL.<sup>74</sup> 1) Niekowalencyjne połączenia fotouczulaczy z LDL. Na przykład, zastosowanie mieszaniny Verteporfinu z LDL zwiększa efektywność PDT siedmiokrotnie.<sup>75</sup> 2) Kowalencyjne połączenia fotouczulaczy z LDL, często zwiększa stabilność wyjściowego związku w środowisku komórkowym.

Najprostszym sposobem połączenia fotouczulacza z LDL jest ich bezpośrednia reakcja. Schmidt-Erfurth przedstawiła metodę sprzęgania LDL z chloryną  $e_6$  ( $Ce_6$ ). W tym celu wykorzystano wolne grupy aminowe obecne na powierzchni LDL.<sup>76</sup> Rozpuszczoną

w wodnym roztworze EDTA  $Ce_6$  zaktywowano przy użyciu EDC i następnie poddano reakcji z LDL. Otrzymane połączenia (LDL- $Ce_6$ ) nie miały ściśle zdefiniowanej struktury, a jedynie określony stosunek  $Ce_6$ /LDL, wyrażony ilością moli  $Ce_6$  na jeden mol LDL. Najlepsze wchłanianie fotouczulacza zaobserwowano dla pochodnej LDL- $Ce_6$  o stosunku związania 50:1. Badania *in vitro* prowadzone na komórkach siatkówczaka, wykazały czterokrotnie większą akumulację fotouczulacza dostarczonego przez LDL- $Ce_6$  w porównaniu do niezwiązanego  $Ce_6$ . Udowodniono również, że transport połączenia LDL- $Ce_6$  odbywał się tą samą drogą co wolnego LDL. Fototoksyczność LDL- $Ce_6$  określano pośrednio, badając aktywność mitochondriów. Wolny  $Ce_6$  zmniejszał aktywność mitochondriów o 10%, podczas gdy LDL- $Ce_6$  przy tych samych parametrach naświetlania ( $\lambda = 660$  nm) zmniejszał ją o 80%.

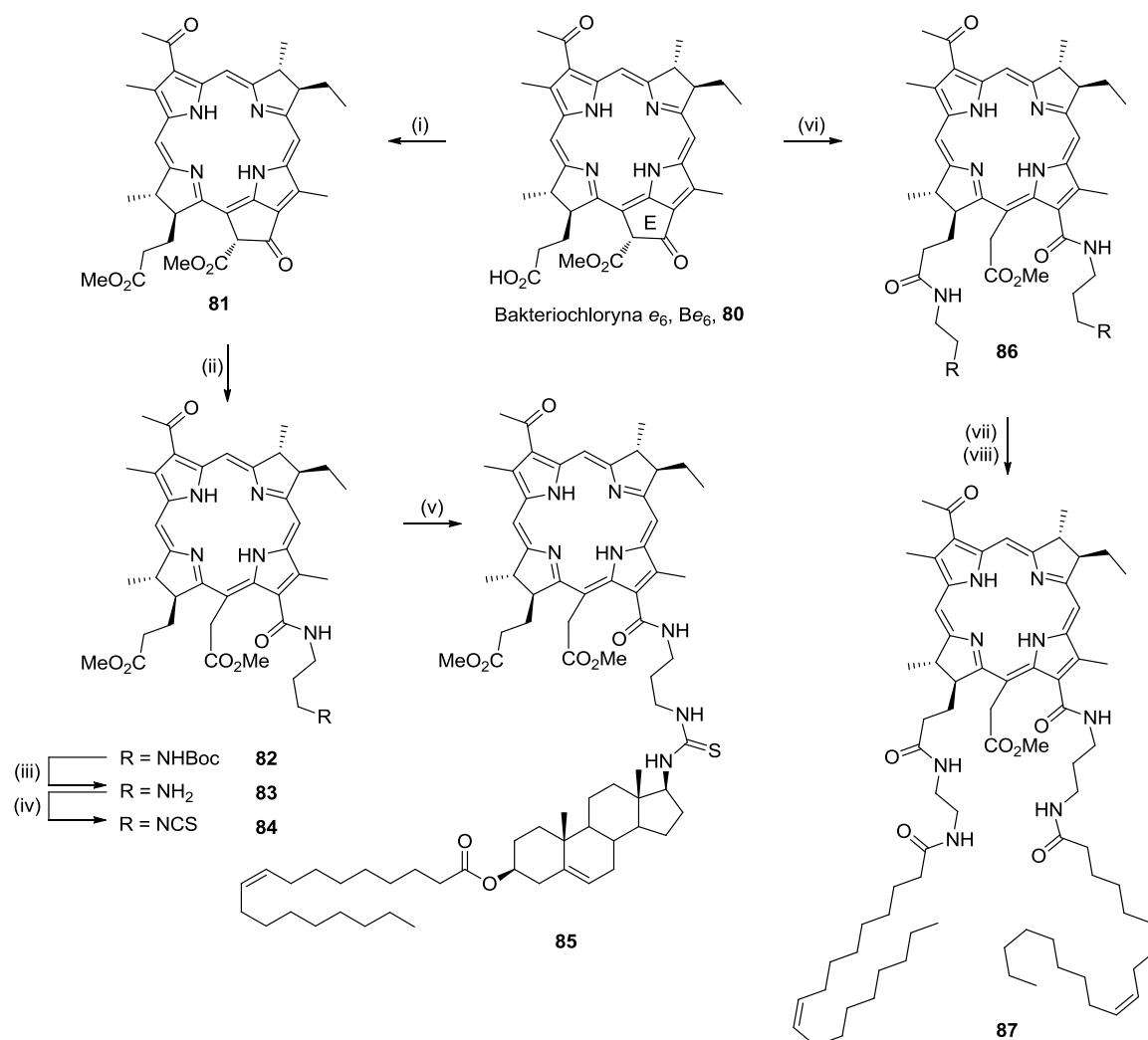
Krieger w 1986 roku przedstawił metodę umożliwiającą wprowadzanie w strukturę liposomu LDL różnych związków.<sup>77</sup> W metodzie tej struktura liposomów była najpierw niszczone, a następnie odbudowywana. Taka procedura umożliwiła zbudowanie analogów LDL, które wykorzystywane były do transportu radioznakowanych estrów cholesterolu czy posiadających fluorescencję lipidów. Wykorzystując tą metodę otrzymano fotouczulacze posiadające przyłączone np. jednostki cholesterolu, które transportowane były do wnętrza komórek w postaci liposomów.

Zheng w 2002 roku otrzymał pochodną pirophoeoforbidu *a* (PPFa), z przyłączonym sterolem posiadającym resztę kwasu oleinowego (Schemat 17).<sup>73</sup> Wolną grupę karboksylową PPFa **63** zaktywowano DCC w obecności HOBt, a następnie dodano aminę **78**, pożądaną pochodną **79** otrzymano z niską wydajnością (20%). Związek ten wykorzystano do syntezy liposomu LDL według zmodyfikowanej metody Kriegera.<sup>78</sup> Lipofilowe estry cholesterolu wypłukano z rdzenia liposomów i zastąpiono je związkiem **79** otrzymując pożądaną pochodną LDL (PPFa-CE-LDL). Naświetlanie PPFa-CE-LDL światłem o długości fali 667 nm powodowało emisję światła o maksimum przy długości fali 720 nm. Stosunkowo duża różnica w maksimach absorpcji i emisji (53 nm) powoduje, że liposomy z PPFa-CE-LDL **79** potencjalnie mogą być wykorzystywane do obrazowania wczesnych stadiów nowotworów. Inkubowanie PPFa **63** z komórkami HepG<sub>2</sub> wykazało, że związek **63** jest bardzo słabo wchłaniany przez komórki. Z kolei PPFa-CE-LDL powodują fluorescencję komórek. Dodatek LDL podczas inkubacji inhibuje wchłanianie PPFa-CE-LDL, co świadczy o tej samej drodze wchłaniania obu związków poprzez receptory LDL.



Schemat 17. Synteza lipofilowych pochodnych chlorofilu. (i)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ , TEA, DCM, 24 godz., 95%; (ii) chlorek oleilu, pirydyna, 2 godz., 60%; (iii) TFA, 2.5 godz., 90%; (iv) DCC, HOBT, DCM, 24 godz., 20%.

W zespole Zhenga otrzymano analog związku **79**, w którym pochodna bakteriochlorofilu *a* **80** połączona była z lipidem w pozycji 13 (Schemat 18).<sup>79</sup> W reakcji związku **81** z *N*-Boc-1,3-diaminopropanem następuje otwarcie pierścienia E, po usunięciu grupy zabezpieczającej Boc-, otrzymaną aminę **83** poddano reakcji z 1,1'-tiokarbonyldiimidazolem (TCDI). Pożądanym izotiocyjanianem **84** łatwo reagował z aminą **78** dając tiomocznik **85** z wysoką wydajnością (86%). W tej samej publikacji opisano syntezę związku posiadającego dwie reszty kwasu oleinowego przyłączonego do pochodnej bakteriochlorofilu ( $\text{Be}_6$ ) w pozycjach 13 i 17. W reakcji  $\text{Be}_6$  **80** z *N*-Boc-1,3-diaminopropanem otrzymano pochodną sfunkcjonalizowaną w pozycjach 13 i 17. Następnie, usunięto grupy zabezpieczające i wolne grupy aminowe przereagowano z chlorkiem oleilu otrzymując pożądanym diamid **87**.



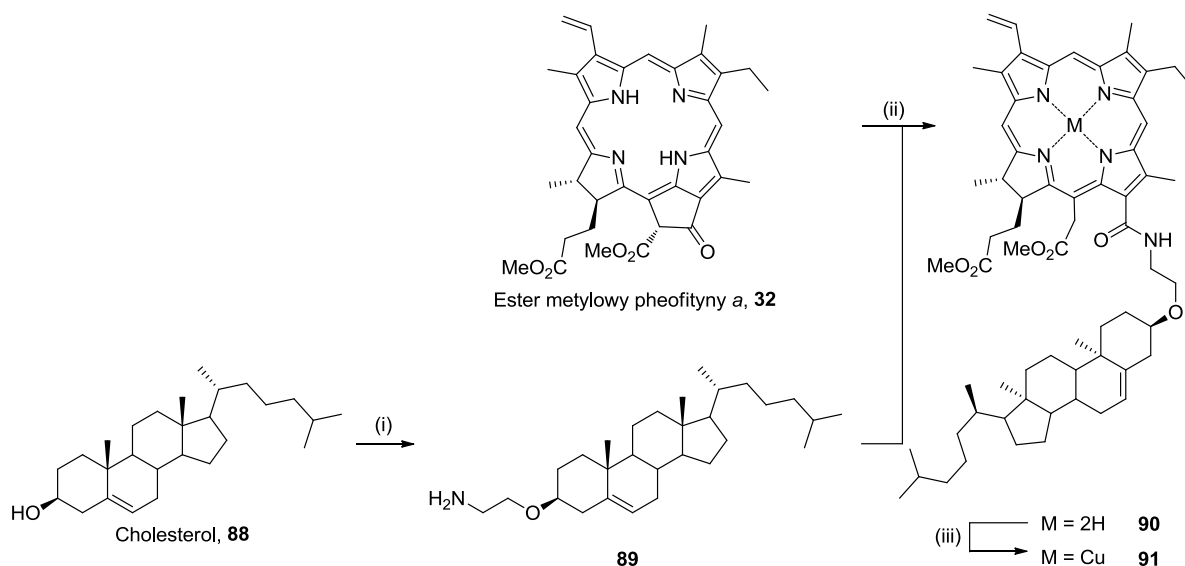
Schemat 18. Synteza lipofilowych pochodnych bakteriochlorofilu. (i)  $\text{CH}_2\text{N}_2$ , DCM, 1 godz., 85%; (ii) *N*-Boc-1,3-diaminopropan,  $\text{CHCl}_3$ , wrzenie, 2 dni, 70%; (iii) TFA, 1 godz., 86%; (iv) TCDI, DCM, wrzenie, 4 godz., 75%; (v) **78**, DIPEA, 24 godz., 86%; (vi) *N*-Boc-1,3-diaminopropan, DMAP, DCC, DCM, 40 godz., 72%; (vii) TFA, 1 godz., (viii) chlorek oleilu, DCM, 1 godz., 63%.

Związki **85** i **87** wprowadzono w strukturę liposomu LDL. Już pierwsze porównanie wykazało, że wbudowaniu uległo dwukrotnie więcej związku **87** w porównaniu do **85**. Liposomy zawierające związek **87** badano *in vivo* na modelu mysim. Wykazano, że stężenie pochodnej **87** w komórkach rakowych (HepG<sub>2</sub>) było 30-krotnie większe w porównaniu do komórek mięśni oraz zaobserwowano znaczące wydłużenie czasu narastania guza do pierwotnej wielkości po zakończonym leczeniu w porównaniu do próbek kontrolnych.

W 2009 roku Zheng wbudował związek **87** w strukturę lipoproteiny wysokiej gęstości (HDL).<sup>80</sup> Otrzymane nanocząstki **87**-HDL wybarwiały selektywnie komórki raka jajnika w badaniach *in vitro*. Udowodniono, że wchłanianie zachodzi tą samą drogą co wchłanianie HDL – dodatek 25-krotnego nadmiaru HDL powodował inhibicję jego wchłaniania. Niestety,

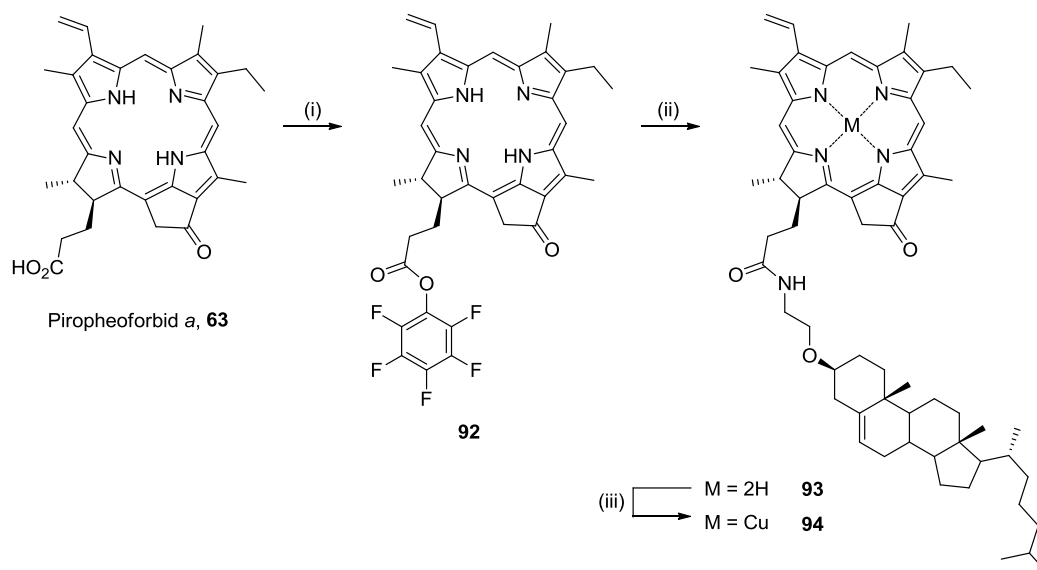


w badaniach *in vivo* po 48 godzinach od podania **87-HDL** zaobserwowano większe stężenie fotouczulacza w innych organach (wątrobie i śledzionie) niż w guzie.



Schemat 19. Połączenie cholesterolu z chlorofilem w pozycji 13. (i) 1) TsCl, pirydyna; 2) AcONa, MeOH; 3) HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, 1,4-dioksan; 4) TsCl, pirydyna; 5) NaN<sub>3</sub>, DMF; 6) LAH, Et<sub>2</sub>O, 62%; (ii) THF, 40 °C, 48 godz., 90%; (iii) Cu(OAc)<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 45 °C, 1 godz., ilościowo.

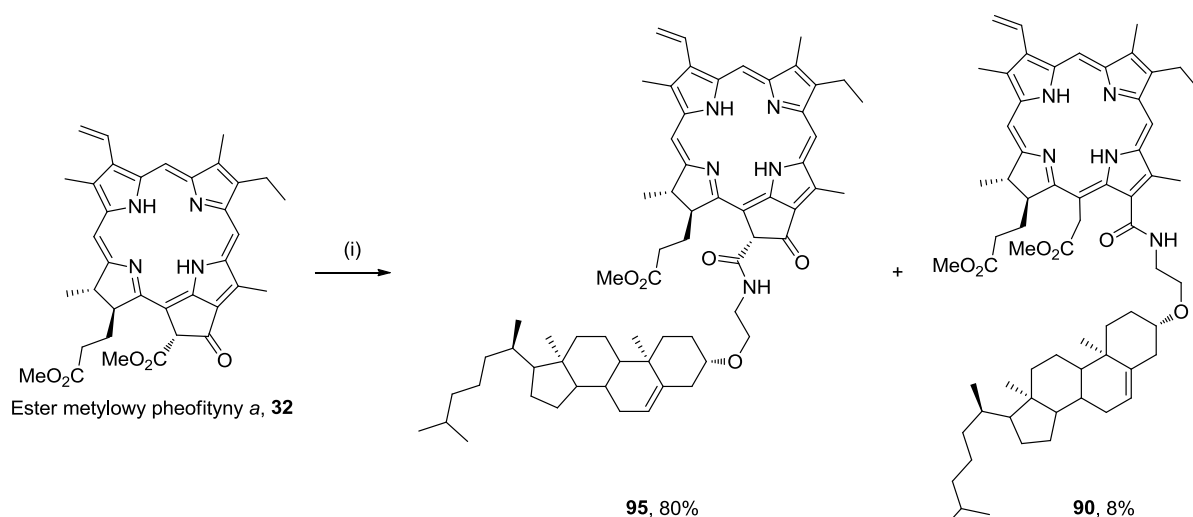
W 2010 roku w grupie Timofeeva otrzymano amidową pochodną *Ce*<sub>6</sub> **25** i cholesterolu **88** w wyniku otwarcia pierścienia E estru metylowego pheofityny *a* **32** odpowiednią aminową pochodną cholesterolu **89** (90%) (Schemat 19). W późniejszym czasie w tym samym zespole otrzymano analogiczną pochodną zmodyfikowaną w pozycji 17 (Schemat 20).<sup>81</sup> Kwas karboksylowy w pozycji 17 piropheoforbidu *a* **63** (PPFa) zaktywowano poprzez utworzenie estru pentafluorofenyowego **92**. Związek ten reagował z aminą **89** dając pożądany amid **93** –



Schemat 20. Połączenie cholesterolu z chlorofilem w pozycji 17. (i) trifluoroctan pentafluorofenyłu, TEA, 15 min., ilościowo; (ii) **89**, THF, 1 godz., 40 °C, 90%. (iii) Cu(OAc)<sub>2</sub>, MeOH, 40 °C, 1 godz., ilościowo.

zmodyfikowaną pochodną chlorofilu w pozycji 17. Zaproponowana metoda syntezy jest bardzo wydajna i w dwóch etapach pozwoliła na wyizolowanie pożądanej pochodnej z wydajnością 90%.

W toku dalszych badań Timofeev przedstawił również syntezę pochodnej zmodyfikowanej w pozycji 15 **95**, która uzupełniła serię pochodnych chlorofili opublikowanych wcześniej (Schemat 21).<sup>82</sup> Zastosowanie 1,4-dioksanu jako rozpuszczalnika oraz wysokiej temperatury zmieniło chemoselektywność reakcji amin z estrem metylowym pheofityny *a* **32**. W rezultacie zamiast nukleofilowego otwarcia pierścienia E (otwarcie pierścienia E następuje w warunkach: THF, 45 °C, 24-72 godz.)<sup>81</sup> zaobserwowano amidowanie w pozycji 15 (1,4-dioksan, wrzenie, 8 godz.) otrzymując jako główny produkt związek **95**. Nie zaobserwowano natomiast produktu podwójnej reakcji: amidowania i otwierania (diamidu), co sugeruje większą odporność na atak nukleofilowy pierścienia E związku **95** niż estru metylowego pheofityny *a* **32**.

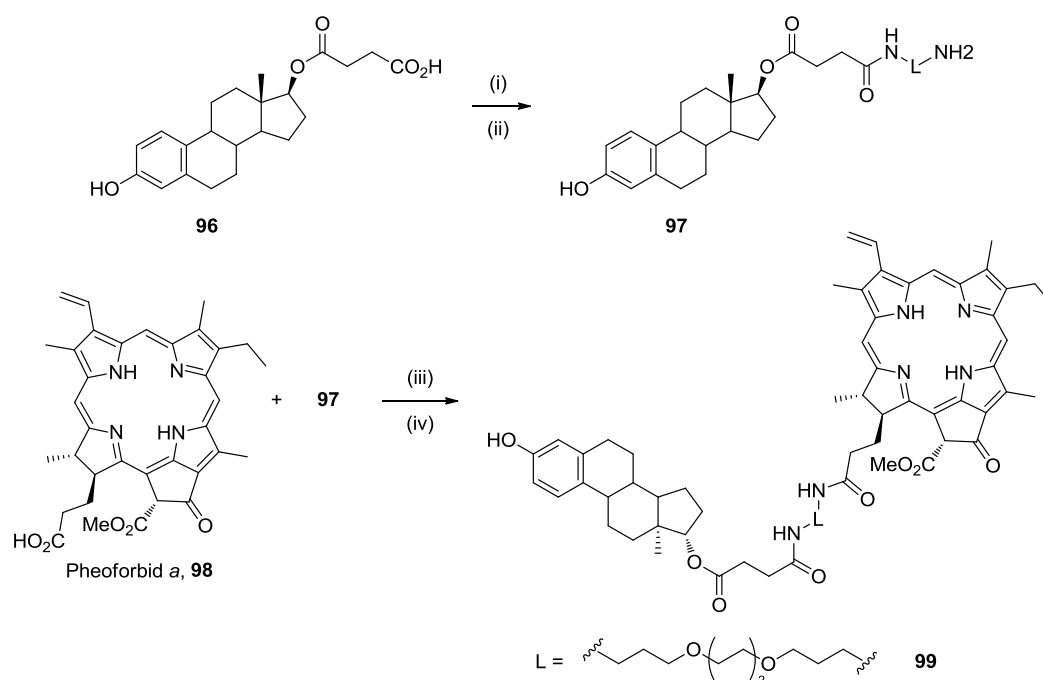


Schemat 21. Synteza pochodnych cholesterolu w pozycji 15. (i) **89**, 1,4-dioksan, wrzenie, 8 godz., 80%.

Zsyntetyzowane chlorofilowe pochodne zostały użyte do utworzenia hydrofilowych miceli fosfolipidowych w warunkach podanych przez Batzriego.<sup>83</sup> Mieszane micelle lecytyny i lipofilowych pochodnych chlorofili otrzymywano przez zmieszanie lecytyny z odpowiednią pochodną chlorofilu w mieszaninie izopropanolu i wody, a wielkość miceli zależała od stosunku lecytyny do pochodnej chlorofilu. Kompleksy miedzi **91** i **94** posiadają właściwości paramagnetyczne, dlatego postulowano możliwość wykorzystania ich do uzyskania informacji na temat struktury i dynamiki błon komórkowych, przy czym badań takich nie opisano. Niestety, poza wstępnymi badaniami dowodzącymi wchłaniania miceli do komórek nie podano żadnych danych. Pochodne nie posiadające miedzi w luce makrocyclicznej otrzymywane były z myślą o terapii fotodynamicznej nowotworów. Otrzymane z nich micelle

inkubowano z komórkami raka piersi (MCF-7). Wszystkie zmodyfikowane połączenia chlorofili z cholesterolem ostatecznie lokalizowały się wewnątrz komórek MCF-7, a ich wchłanianie zależało od struktury otrzymanych pochodnych. Skuteczność wchłaniania kształtowała się w szeregu: **93** > **95** > **90** (odpowiednio podstawienie w pozycjach: 17 > 15 > 13). Spekulowano, że skuteczność wchłaniania zależna jest od ilości polarnych grup w strukturze fotouczulacza i im większa liczba polarnych grup w strukturze cząsteczki, tym słabsze wchłanianie.

Wśród pochodnych chlorofili posiadających fragment steroidowy opisano przykłady połączeń z estradiolem. Souchard zmodyfikował w pozycji 17 pheoforbid **a** **98**, przyłączając estradiol poprzez poliglikolowy łącznik (Schemat 22).<sup>84</sup> Najpierw do cząsteczki estradiolu przyłączono łańcuch poliglikolu. Pheoforbid **a** **98** zaktywowano BOP, a następnie poddano reakcji ze związkiem **97** w obecności *N*-metylomorfoliny (NMM); wydajność reakcji była jednak bardzo niska – 18%.

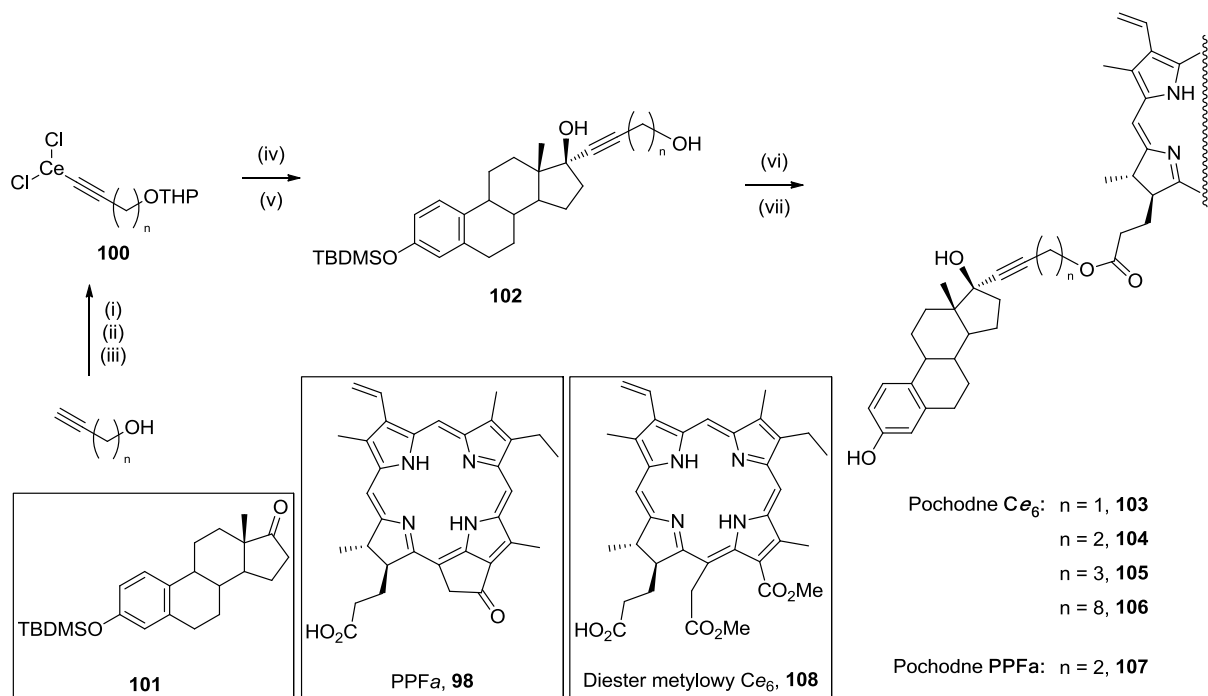


Schemat 22. Modyfikacja chlorofilu w pozycji 17 pochodną estradiolu. (i) BOP, TEA, MeOH, 5 min. (ii) L(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, NMM, MeOH, 24 godz., 43%; (iii) BOP, TEA, MeOH, 0 °C, 16 godz. (iv) NMM, MeOH, 72 godz., 18%.

Fotouczulacze z przyłączoną jednostką estradiolu potencjalnie mogą być wykorzystywane do leczenia nowotworów, które wykazują nadekspresję receptorów estrogenu. Do nowotworów takich można zaliczyć np. niektóre typy raka piersi. Wiadomo, że komórki raka piersi MFC-7 wykazują taką nadekspresję. Gdy związek **99** oraz pheoforbid **a** **98**, inkubowano z komórkami MFC-7 okazało się, że pochodna **99** była wchłaniana w dwukrotnie większej ilości niż pheoforbid **a** **98**. Ponadto, stwierdzono obecność fotouczulacza nie tylko w cytoplazmie, lecz

również w jądrze komórkowym. Fakt ten jest bardzo istotny, jako że fotouczulacze lokalizujące się w jądrze komórkowym są o wiele bardziej skuteczne i dają w zasadzie pewność apoptozy lub nekrozy komórki po naświetleniu.<sup>85</sup>

W grupie Raya estradiol łączono z fotouczulaczami  $Ce_6$  **25** oraz PPFa **98** w pozycji 17 poprzez łączniki  $\alpha$ -hydroksy- $\omega$ -acetylenkowe o różnej długości (Schemat 23).<sup>85,86</sup> Najpierw zabezpieczono grupę hydroksylową łącznika grupą THP, a następnie przy użyciu *n*-butylolitu otrzymaną pochodną przeprowadzono w związek ceroorganiczny. Przygotowane w ten sposób łączniki **100** poddawano reakcji z zabezpieczoną pochodną estronu **101**, a następnie selektywnie usuwano grupę zabezpieczającą wolnego końca łącznika. Powstałe alkohole **102** sprzęgano przy użyciu EDC z diestrem metylowym  $Ce_6$  **108** lub PPFa **98**. Otrzymano cztery pochodne  $Ce_6$  **103-106** oraz jedną PPFa **107**.



Schemat 23. Pochodne estradiolu otrzymywane w grupie Raya. (i) THP, *p*-PTS, DCM; *n*-BuLi, THF, -78 °C, 30 min.; (iii)  $CeCl_3$ , THF, -78 °C; (iv) **101**, THF, -78 °C; (v)  $MgBr_2$ ,  $Et_2O$ , 3 godz.; (vi) EDC-HCl, DMAP, DCM, 20 godz., 82%; (vii) TBAF, THF, 0 °C 93%.

Bez względu na długość łącznika wszystkie pochodne były selektywnie wchłaniane przez komórki MCF-7, a proces zależny był od stężenia fotouczulacza. Zaobserwowano, że w porównaniu do estradiolu nowe pochodne muszą być użyte w stężeniach o prawie trzy rzędy wielkości większych, aby taka sama ilość związku przeszła do wnętrza komórki.

Do tej pory nieznanym był wpływ przyłączenia stosunkowo dużej cząsteczki porfiryny do estradiolu na łatwość przechodzenia tych związków do wnętrza komórek estrogenozależnych. Spośród pochodnych **103-106** najlepsze właściwości biologiczne wykazywał związek **104**. Wykazano, że znacznie więcej kumuluje się go w komórkach estrogenozależnych MCF-7 niż

w komórkach nieestrogenozależnych (MDA-MB 231).<sup>86</sup> Ponadto stężenie potrzebne do zniszczenia 50% komórek ( $LD_{50}$ ) w wyniku nasświetlania światłem czerwonym (brak dokładnej specyfikacji światła) było kilkakrotnie mniejsze dla pochodnej **104** niż dla niezwiązanego  $Ce_6$ . Z kolei związek **107** selektywnie akumulował się w jądrach komórkowych MCF-7.<sup>85</sup> Nie przeprowadzono jednak badań dotyczących skuteczności terapeutycznej tego związku.

Przedstawione pochodne chlorofili posiadające w strukturze jednostki lipidów selektywnie akumulują się w komórkach sterolozależnych. Tworzą one micle lub liposomy, które imitując naturalne liposomy, jak HDL czy LDL, łatwo wnikają do wnętrza komórek. Wykazano również, że związki te mają tendencję do skupiania się w pewnych organelach (np. **107**), a nie tylko rozpraszania się w cytoplazmie, co podnosi znacząco skuteczność terapii. Jednostkę lipidową wprowadzano w różne pozycje fotouczulaczy, lecz nie miało to większego wpływu na wyniki badań biologicznych, ponieważ najczęściej związki wykorzystywano do formowania miceli lub liposomów.

### **2.3.1.3. Dwufunkcyjne pochodne chlorofilu – do obrazowania i terapii fotodynamicznej**

#### **2.3.1.3.1. Połączenia pochodnych chlorofilu z barwnikami fluorescencyjnymi dla obrazowania optycznego**

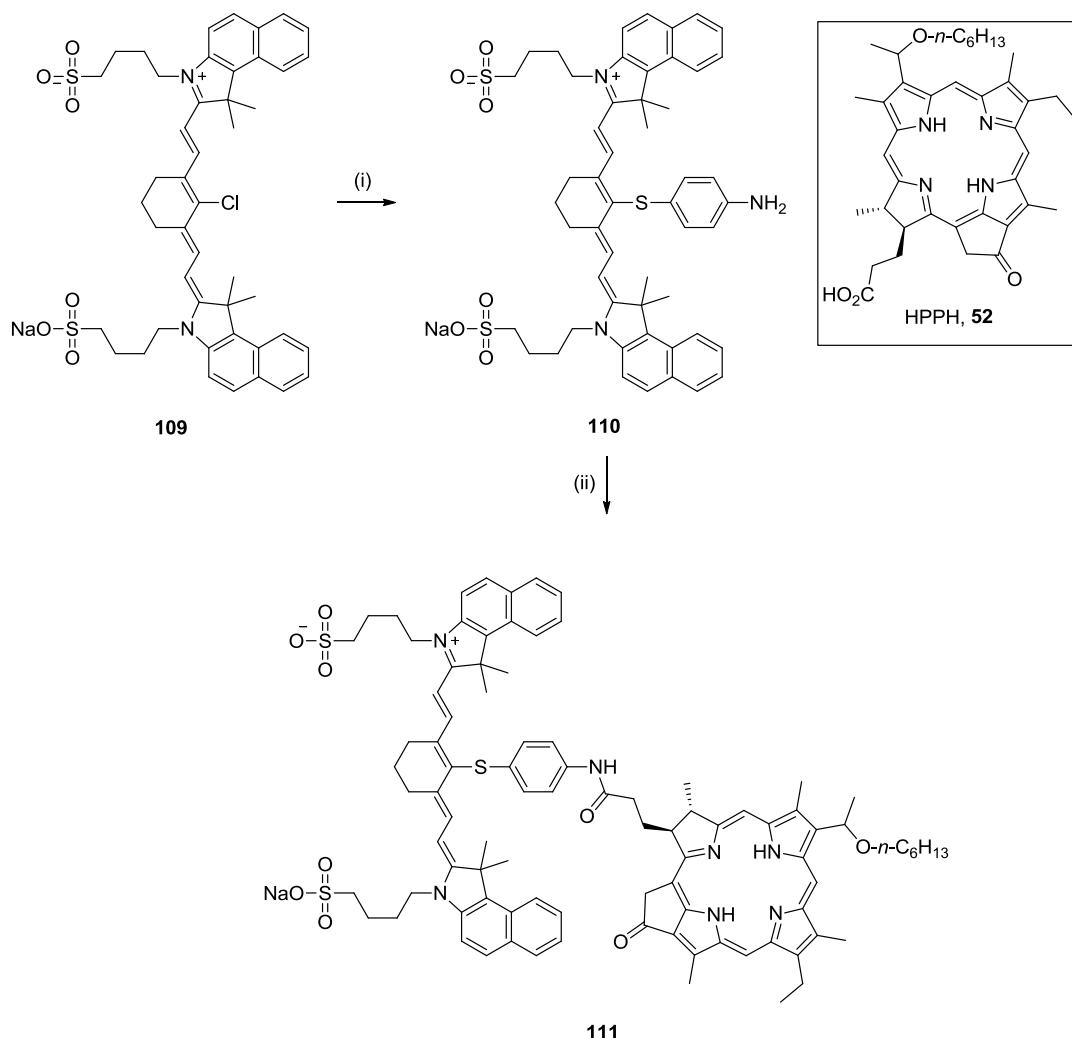
Obrazowanie nowotworów poprzez badanie emisji fluorescencji jest obecnie obiektem intensywnych badań i pozwala na określenie lokalizacji tkanki nowotworowej, dzięki barwnikom selektywnie akumulującym się w komórkach nowotworowych.

Różnica długości fal maksimum absorpcji ( $\lambda_{ex}$ ) i emisji fluorescencji ( $\lambda_{em}$ ) nazywana jest przesunięciem Stokesa. Barwniki używane do obrazowania nowotworów muszą charakteryzować się wysokimi wartościami przesunięcia Stokesa, w przeciwnym razie pojawiają się trudności z oddzieleniem fal światła wzbudzającego od fluorescencji i pomiar jest zakłócany. Niestety, porfirynoidy posiadają niską wartość przesunięcia Stokesa, dlatego pomimo selektywnej akumulacji jak i dużej skuteczności w generowaniu tlenu singletowego nie nadają się do obrazowania nowotworów. Z kolei inne barwniki o dużych wartościach przesunięcia Stokesa, jak np. cyjaniny, nie mają pożądanych właściwości biologicznych (brak selektywności akumulacji w komórkach nowotworowych, szybkie usuwanie z organizmu). Trudności te pokonuje się tworząc połączenia barwników, takich jak cyjaniny, z porfirynoidami. W ten sposób otrzymuje się cząsteczki zdolne do selektywnego

kumulowania się w tkance nowotworowej, które są skuteczne w terapii fotodynamicznej oraz pozwalają na obrazowanie optyczne nowotworów.

### Połączenia w pozycji 17

Pierwszym dwufunkcyjnym fotouczulaczem, otrzymanym z pochodnej chlorofilu, było połączenie HPPH **52** z cyjaniną **109** (Schemat 24).<sup>87</sup> Częsteczkę cyjaniny **109** poddano reakcji z *p*-aminotiofenolem, w wyniku czego otrzymano aminę **110**. Związek ten poddano reakcji z HPPH **52** w obecności DCC, pożądaną produkt **111** otrzymano z wydajnością 65%.



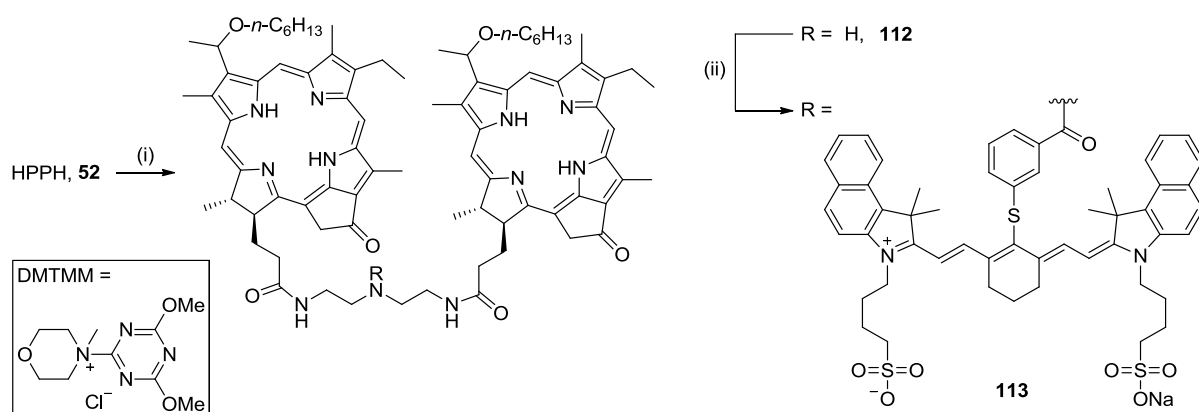
Schemat 24. Synteza pierwszego połączenia cyjaniny i pochodnej chlorofilu. (i) *p*-aminotiofenol, DMF, 80%; (ii) HPPH **52**, DCC, DMF, DMAP, 24 godz., 65%.

Badania fotofizyczne wykazały, że jednostka HPPH i cyjaniny absorbowały światło jako niezależne chromofory. Związek **111** wykazywał znacznie mniejszą fluorescencję niż wyjściowy HPPH **52**. Powodem było wygaszanie fluorescencji przez jednostkę cyjaniny na drodze transferu energii ze stanu wzbudzonego HPPH (donor) do cyjaniny (akceptor).<sup>88</sup>

Otrzymana pochodna **111** nie była rozpuszczalna w wodzie, dlatego roztwory wykorzystywane do badań biologicznych zawierały Tween-80 oraz dekstrozę. Badania *in*

*in vitro* na komórkach RIF wykazały, że **111** jest skutecznym fotouczulaczem (laser – 665 nm), chociaż nieco gorszym niż wyjściowa HPPH.<sup>89</sup> Natomiast naświetlanie komórek RIF, światłem o długości fali 810 nm powodującym wzbudzenie jednostki cyjaniny nie powodowało nekrozy komórek.

W badaniach *in vivo* prowadzonych na myszach posiadających guzy nowotworowe komórek RIF wykazano, że istnieje zależność stężenia fotouczulacza **111** od efektu terapeutycznego. Dawka 3.5  $\mu\text{mol/kg}$  masy ciała prowadziła do wyleczenia 8/10 myszy posiadających guzy wielkości 4-5  $\text{mm}^3$ . Z kolei, 10-krotnie mniejsza ilość związku **111** była wystarczająca do skutecznego obrazowania nowotworów *in vivo* ( $\lambda_{\text{ex}} = 780 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 865 \text{ nm}$ ). Zaskakujący jest fakt, że obecność jednostki cyjaninowej w związku **111** zwiększa jego wchłanianie przez komórki nowotworowe (w porównaniu do wolnego HPPH).<sup>88</sup> Ponadto w porównaniu do fotouczulaczy porfirynoidowych, związek **111** był szybko usuwany z tkanek skóry. W cząsteczce związku **111** po wzbudzeniu światłem jednostki HPPH konkurują dwa procesy: przejście międzysystemowe prowadzące do stanu trypletowego, który umożliwia generowanie tlenu singletowego (ISC, Rysunek 7) oraz tzw. FRET (*ang.* Förster Resonance Energy Transfer) – przekazanie energii pomiędzy dwoma chromoforami będącymi w bliskiej odległości. Powodem obniżenia zdolności fototerapeutycznych związku **111** był znaczny udział procesu FRET, odbierającego energię wzbudzonego porfirynoidu. Wyeliminowanie procesu FRET jest możliwe, m.in. poprzez oddalenie chromoforów na odległość powyżej 10 nm.

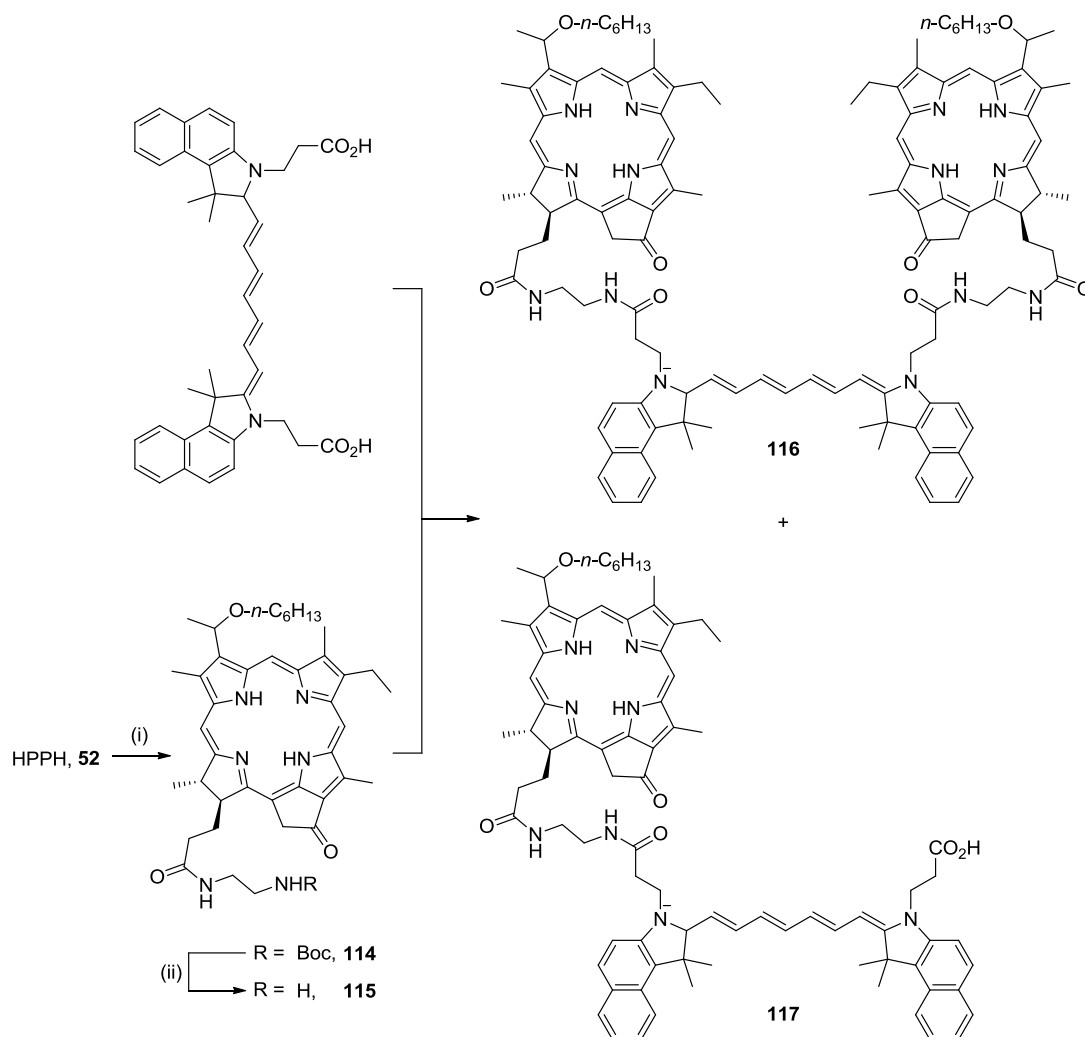


Schemat 25. Synteza połączeń bisbenzoindolowej cyjaniny z dwoma jednostkami HPPH. (i) dietylenotriamina, DMTMM, DMF, noc, 48%; (ii) ROH, BOP, DMF, noc, 60%.

W celu „zwiększenia potencjału terapeutycznego” związków dwufunkcyjnych, Pandey otrzymał pochodne cyjaniny posiadające dwie jednostki HPPH.<sup>89</sup> Syntezę rozpoczęto od połączenia dwóch jednostek HPPH w obecności DMTMM (Schemat 25). Następnie,

drugorzędowa grupa aminowa obecna w strukturze łącznika związku **112** posłużyła do przyłączenia jednostki cyjaniny.

Kolejną otrzymaną przez Pandeya i współpracowników pochodną posiadającą dwie jednostki HPPH był związek **116** (Schemat 26). Na początku sfunekjonalizowano HPPH poprzez przyłączenie *N*-Boc-etylenodiaminy. Po usunięciu grupy zabezpieczającej, związek **115** sprzęgano z barwnikiem cyjaninowym, otrzymując mieszaninę mono- **117** i dipochodnych **116** (odpowiednio 16% i 49%), którą rozdzielano metodami chromatograficznymi.



Schemat 26. Synteza połączeń cyjaniny z dwoma jednostkami HPPH. (i) HPPH, EDC-HCl, DCM, DMAP, *N*-Boc-etylenodiamina, 12 godz., 42%; (ii) TFA, DCM, 3 godz., 58%; (iii) **115**, EDC-HCl, HOBT, 12 godz., **116** – 49%, **117** – 16%.

Pochodne te posiadały przesunięcia Stokesa > 30 nm, co jest wartością wystarczającą do zastosowania w obrazowaniu nowotworów. Niestety, wprowadzenie dodatkowej jednostki HPPH jedynie zmniejszyło zachodzenie procesu FRET, który nadal obniżał znacząco wydajność generowania tlenu singletowego. Mimo to jego udział był mniejszy w przypadku



związków **113** i **116** posiadających dwie jednostki HPPH i dlatego związki te były lepszymi fotouczulaczami niż odpowiednie monopochodne **111** i **117**.

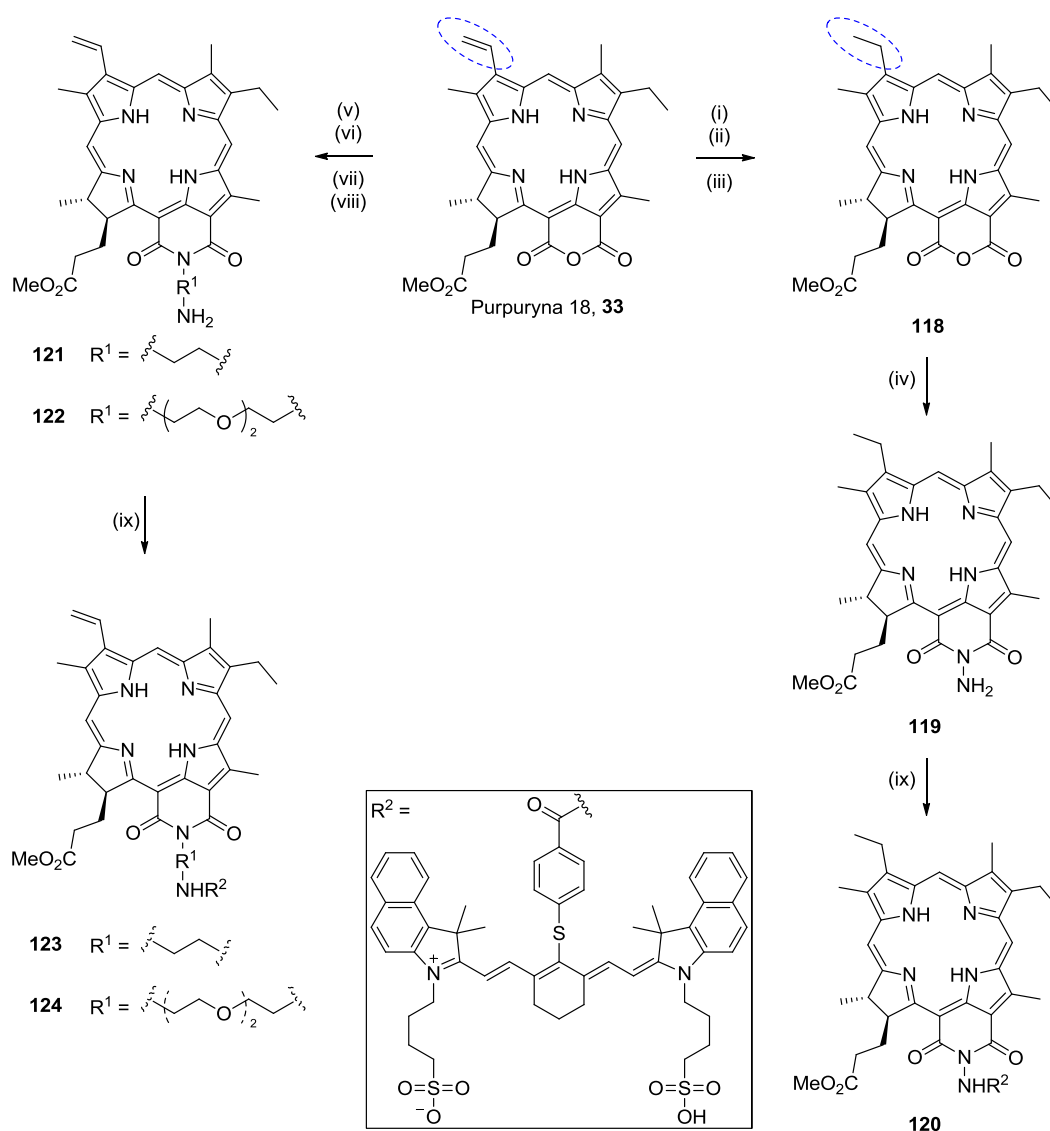
Badania biologiczne prowadzone na nowotworach Colon 26 (nowotwór okrężnicy) oraz U87 wykazały, że najlepiej wchłanianym fotouczulaczem *in vitro* był związek **113**. Wykazywał on również najlepsze właściwości terapeutyczne *in vivo*. Niestety, w przypadku myszy z komórkami U87 zdolności terapeutyczne badanych związków **113** i **116** były podobne (jedynie około 30% wyleczeń). W przypadku myszy z komórkami Colon 26 wyniki były lepsze. Podając taką samą dawkę związków **111** i **113** odsetek wyleczeń (brak wzrostu guza po 60 dniach) dla myszy leczonych pochodną **113** wynosił 80%, podczas gdy związek monoporfirynoidowy **111** nie był wystarczająco fotoaktywny, aby skutecznie zniszczyć guzy.

### **Połączenia w pozycji 13<sup>2</sup>**

Wprowadzanie grup funkcyjnych w pozycję 13<sup>2</sup> najłatwiej realizować przekształcając purpurynę **18 33** w odpowiednie purpurynoimidy (Schemat 27). Tę strategię wykorzystał Pandey otrzymując kilka połączeń cyjaniny z purpurynoimidami o różnej długości łącznika.<sup>90</sup> Syntezę pochodnej o najkrótszym łączniku **120** rozpoczęto od redukcji grupy etylenowej purpuryny **18 33** w pozycji 3 w sekwencji reakcji: utworzenie kompleksu Zn<sup>2+</sup>, uwodornienie (H<sub>2</sub>, Pd/C), usunięcie jonu cynku z luki makrocyklicznej. Otrzymany związek **118** poddano reakcji z bezwodną hydrazyną, w wyniku czego pierścień bezwodnika **118** ulega nukleofilowemu otwarciu, który w warunkach reakcji cyklizuje dając imid **119**. Związek ten reagując z cyjaniną (IR 820) w obecności DMTMM dawał pochodną **120**. W celu otrzymania pochodnych, w których chromofory są od siebie bardziej oddalone, zsyntetyzowano związki z dłuższymi łącznikami. Najpierw przekształcono purpurynę **18 33** w purpurynoimidy **121** i **122** z odpowiednimi łącznikami. W tym celu purpurynę **18 33** poddano reakcji z *N*-Boc terminalnymi diaminami. Po usunięciu grupy zabezpieczającej (Boc-), otrzymane purpurynoimidy **121** i **122** poddawano reakcji z cyjaniną uprzednio zaktywowaną DMTMM. Wydajności reakcji sprzęgania nie były jednak wysokie.

Badania biologiczne *in vitro* prowadzono na komórkach Colon 26, a *in vivo* na myszach zawierających guzy tych komórek. Związek **120** o najkrótszym łączniku, mimo że wykazywał dobre właściwości fotouczulające *in vitro*, nie był poddany badaniom *in vivo*. Najlepszą selektywność akumulacji w guzie wykazywał związek **123**. Terapia fotodynamiczna przy użyciu 2.5 μmol/kg tej pochodnej powodowała całkowity zanik guza. W obrazowaniu *in vivo* (782 nm) najlepsze właściwości wykazała pochodna **123**. Z kolei, związek **124** gromadził się

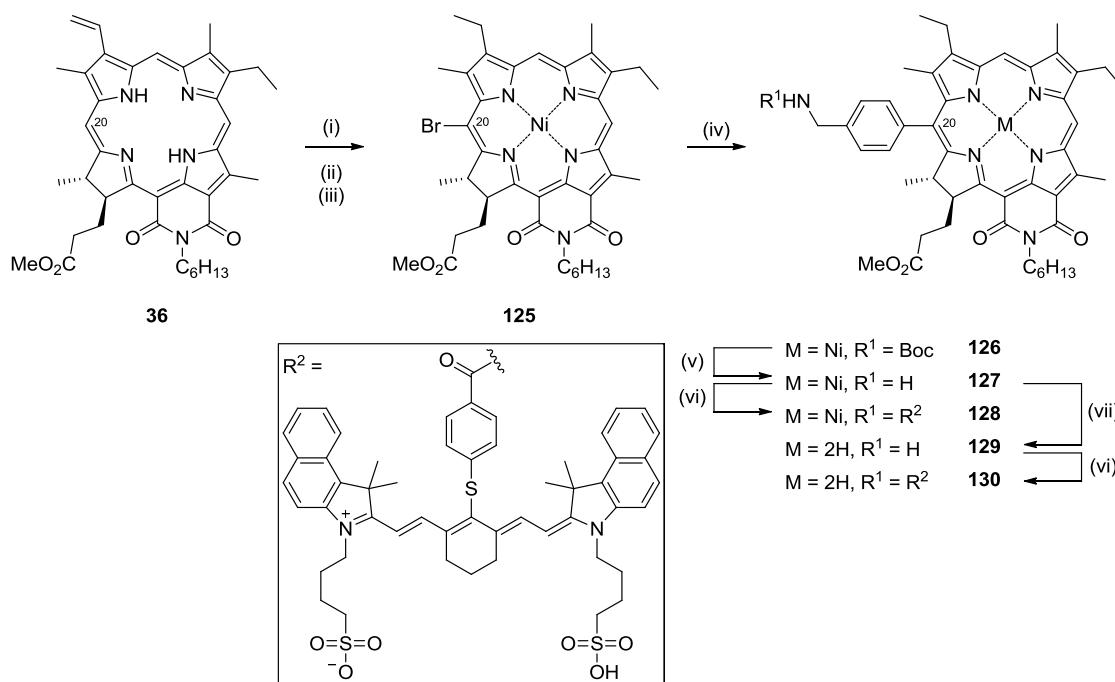
selektywnie w wątrobie. Postulowano, że taka biodystrybucja spowodowana jest najbardziej lipofilowym charakterem łącznika w związku **124**.



Schemat 27. Synteza połączeń cyjaniny IR 820 z purpurynoimidami w pozycji 13<sup>2</sup>. (i) Zn(OAc)<sub>2</sub>, MeOH, wrzenie, 2 godz.; (ii) H<sub>2</sub>, Pd/C, THF, 12 godz.; (iii) TFA, 2 godz.; (iv) (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, pirydyna, DCM; (v) NH<sub>2</sub>-R<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>Boc, DCM; (vi) CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>; (vii) KOH, MeOH; (viii) TFA, DCM, 2 godz.; (ix) R<sup>2</sup>OH, DMTMM, DMF, 12 godz., **120** – 32%, **123** – 37%, **124** – 32%.

### Połączenia w pozycji 20

Pandey opracował metodę selektywnego bromowania różnych pochodnych chlorofilu w pozycji 10 i 20 przy użyciu NBS.<sup>91</sup> Wykorzystując te pochodne przyłączono cyjaniny do purpurynoimidu w pozycji 20 (Schemat 28).<sup>92</sup> W reakcji niklowego kompleksu purpurynoimidu **36** z NBS otrzymano pochodną **125**, którą w katalizowanej PdCl<sub>2</sub>(dppf) reakcji Suzuki z odpowiednim kwasem fenyloboronowym, przekształcono w związek **126**. Następnie, usunięto grupę zabezpieczającą (Boc-) i w obecności EDC·HCl przyłączono cyjaninę, związek **127** otrzymano z wydajnością 35%. W celu usunięcia Ni<sup>2+</sup> z luki



Schemat 28. Synteza połączeń chlorofilu z purpurynoimidem w pozycji 20. (i) Ni(acac)<sub>2</sub>, toluen, wrzenie, 2 godz.; (ii) H<sub>2</sub>, Pd/C, TEA, THF, 12 godz.; (iii) NBS, DCM, 30 min.; (iv) kwas 4-(N-Boc-aminometylo)fenyloboronowy, PdCl<sub>2</sub>(dppf), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF, wrzenie, 12 godz., 68%; (v) TFA, DCM, 6 godz., 66%; (vi) R<sup>2</sup>OH, EDC·HCl, DMAP, DMF, 12 godz., 35%; (vii) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0 °C, 30 min, 42%.

makrocyklicznej, pochodną tą potraktowano stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> otrzymując wolną zasadę **129**, do której przyłączano cyjaninę, w analogiczny sposób jak dla pochodnej **128**.

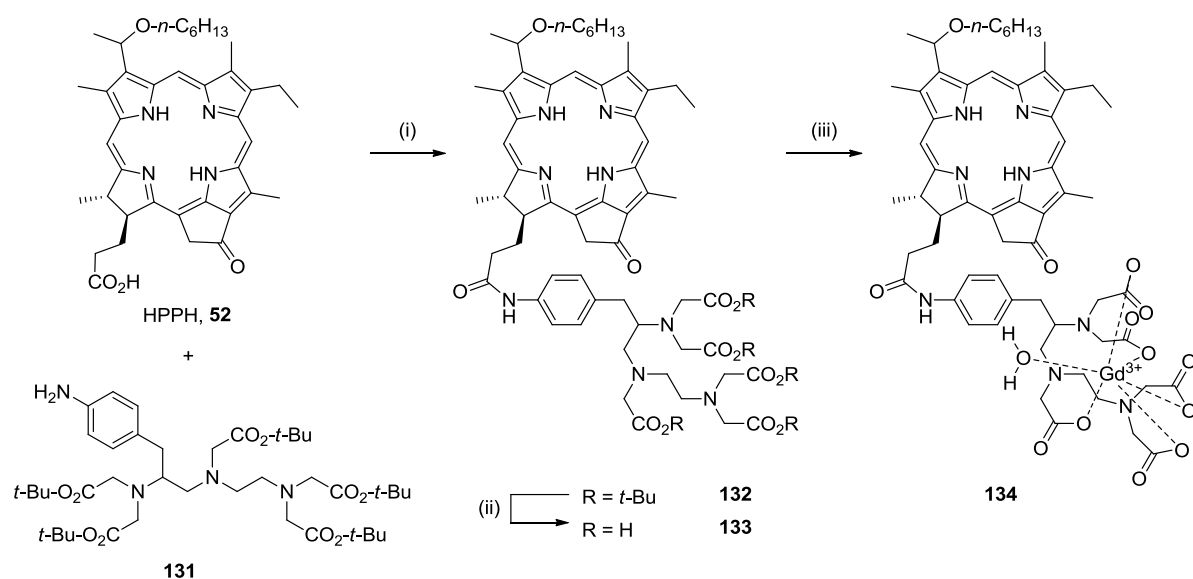
Wydajność generowania <sup>1</sup>O<sub>2</sub> przez związek **130** była trzykrotnie niższa od tej zmierzonej dla pochodnej **129** nie posiadającej jednostki cyjaniny w swej strukturze. Świadczy to o zachodzeniu, w trakcie naświetlania, procesu FRET pomiędzy chromoforami. W przypadku analogicznej pary związków posiadających jon Ni<sup>2+</sup> w luce makrocyklicznej **127** i **128** zaobserwowano praktycznie brak zdolności generowania <sup>1</sup>O<sub>2</sub> przez te związki, co jest związane z obecnością jonu Ni<sup>2+</sup>. W badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach nowotworowych Colon 26, pochodna **130** posiadała znakomite właściwości fotouczulające. Natomiast, w przypadku obrazowania *in vivo* pochodna **128** dawała znacznie lepsze rezultaty, ponieważ w porównaniu do związku **130** bardziej selektywnie gromadziła się w guzie. Z kolei, związek **130** akumulował się głównie w organach takich jak: wątroba, nerki i śledziona.

Otrzymane związki mogą być zastosowane jako związki dwufunkcyjne do terapii i obrazowania. Należy jednak pamiętać, że nadal mają one sporo wad. Obserwuje się proces wygaszania fluorescencji (poprzez FRET), a co za tym idzie zmniejszenie wydajności generowania tlenu singletowego. Przyłączenie jednostki cyjaniny do fotouczulacza powoduje również zmianę jego właściwości biologicznych m.in. selektywności akumulacji przez utworzone pochodne.

### 2.3.1.3.2. Modyfikacje pochodnych chlorofilu do obrazowania z wykorzystaniem techniki rezonansu magnetycznego

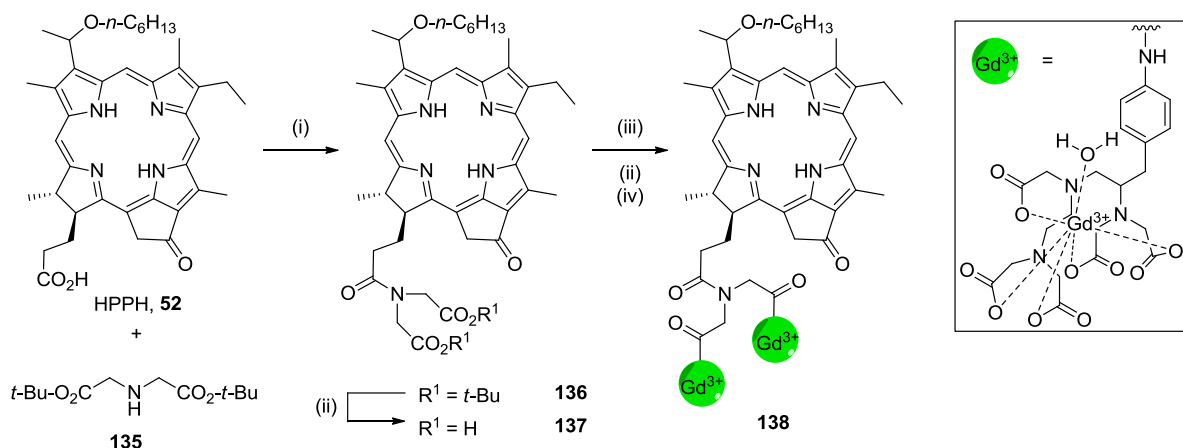
Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI – Magnetic Resonance Imaging) jest powszechnie stosowaną metodą w diagnostyce wielu schorzeń. Aby wzmocnić sygnał stosuje się środki kontrastowe, są to najczęściej związki zawierające jony metali paramagnetycznych np.  $Gd^{3+}$ . Jedną z cech idealnych środków kontrastowych jest selektywne gromadzenie się w elemencie obrazowanym, np. w komórkach nowotworowych. Cechy takie posiadają pochodne chlorofilu, dlatego powstała koncepcja przyłączenia do nich ligandów chelatujących jony metali o właściwościach paramagnetycznych.

W grupie Pandeya zmodyfikowano HPPH **52** przyłączając do niego ligand **131**, mający zdolność chelatowania jonów gadolinu(III) (Schemat 29).<sup>93</sup> HPPH poddano reakcji z DCC w obecności DMAP, a następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano związek **131**. Otrzymaną pochodną poddano hydrolizie kwasowej (TFA), a następnie utworzono kompleks w reakcji z  $GdCl_3$ .



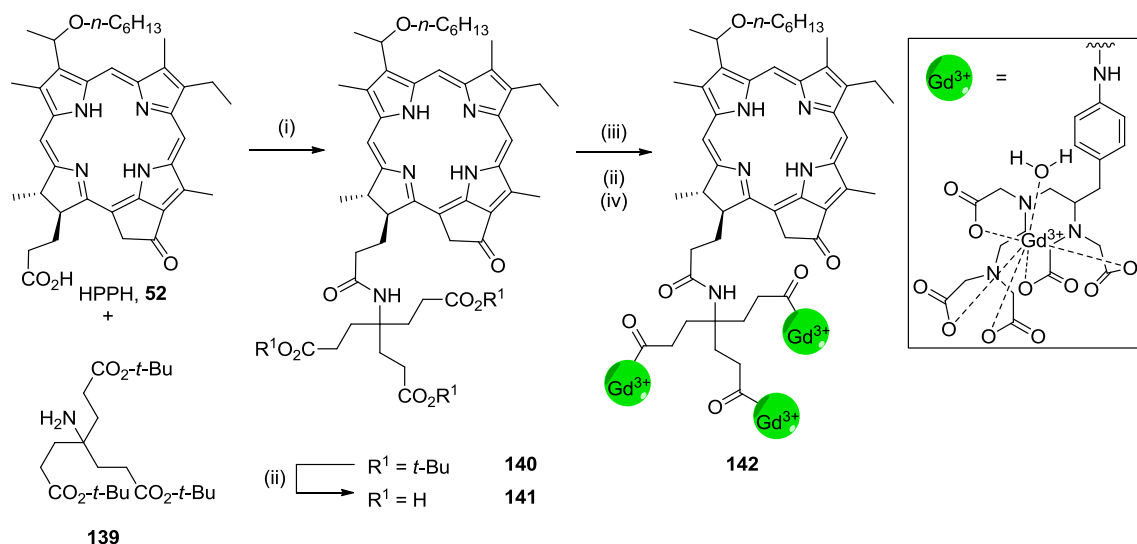
Schemat 29. Synteza mono-Gd pochodnych chlorofilu. (i) DCC, DMAP, DCM, 16 godz., 84%; (ii) TFA; (iii)  $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ , pirydyna,  $H_2O$ , 3 godz., 90%.

Przedstawiono również syntezę analogu związku **134** posiadającego dwa jony  $Gd^{3+}$  (Schemat 30). W tym celu, HPPH **52** poddano reakcji z aminą **135**, a następnie reakcji hydrolizy. Otrzymaną pochodną **137** z łącznikiem posiadającym dwie grupy karboksylowe sfunkcjonalizowano w reakcji ze związkiem **131** oraz  $GdCl_3$  otrzymując di-Gd kompleks **138**.

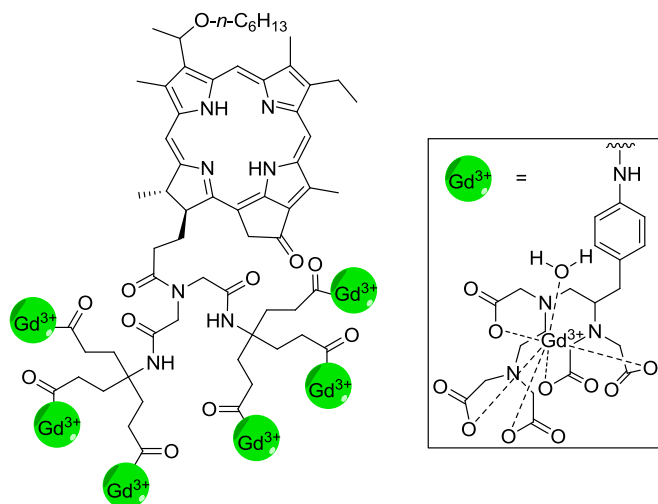


Schemat 30. Synteza di-Gd pochodnych chlorofilu. (i) DCC, DMAP, DCM, 15 godz., 99%; (ii) TFA, 2 godz.; (iii) **131**, DCC, DMAP, DCM, 20 godz., 67%; (iv)  $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , pirydyna,  $\text{H}_2\text{O}$ , 3 godz., 99%.

W toku dalszych badań opracowano syntezę pochodnych zawierających od trzech do sześciu jonów  $\text{Gd}^{3+}$  na cząsteczkę fotouczulacza.<sup>94,95</sup> Do HPPH **52** przyłączano kolejne łańcuchy aminokwasów, budując dendrymery zakończone jednostkami chelatującymi jony  $\text{Gd}^{3+}$ . Aminokwasy w postaci estrów *tert*-butylowych przyłączano do wolnej grupy karboksylowej przy użyciu EDC, a następnie związek **140** poddano hydrolizie (TFA). Grupy chelatujące przyłączano również przy użyciu EDC. Po reakcji z  $\text{GdCl}_3$  otrzymano pochodne **142** i **143** posiadające odpowiednio trzy (Schemat 31) oraz sześć (Rysunek 11) jonów  $\text{Gd}^{3+}$  w cząsteczce fotouczulacza.



Schemat 31. Synteza tri-Gd pochodnych chlorofilu. (i) DCC, DMAP, DCM, 16 godz., 76%; (ii) TFA, DCM, 5 godz.; (iii) **131**, EDC, DMAP, DCM, 16 godz., 61%; (iv)  $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , pirydyna,  $\text{H}_2\text{O}$ , 16 godz., 72%.



143

Rysunek 11. Heksa-Gd pochodna chlorofilu

Badania skuteczności tych pochodnych jako środków kontrastowych w MRI prowadzono na modelu mysim z guzami nowotworowymi RIF-1. Otrzymane pochodne **134**, **138**, **142** i **143** podawane były dożylnie. Związek **134** nie rozpuszczał się w wodzie, dlatego do iniekcji używano dodatku surfaktantu (1% Tween-80). Dodatek ten jest jednak toksyczny dla ludzi, dlatego też otrzymano liposomy ze związku **134** z lecytyną i cholesterolem. Obraz guza zarejestrowany po 24 godzinach od podania pochodnej **134** (11  $\mu\text{mol/kg}$ ) był wyraźniejszy (intensywność wzrosła z 623 do 881 jednostek). W przypadku zdrowej tkanki nie zaobserwowano zmian w MRI. Podobnie, po podaniu pochodnej **138** (10  $\mu\text{mol/kg}$ ) sygnał guza w MRI był wyraźniejszy, a jego intensywność wzrosła z 370 do 582 (24 godziny po podaniu) oraz do 714 jednostek (48 godzin).

W porównaniu do kontrastu stosowanego klinicznie (Magnevist<sup>®</sup>) pochodne **134** i **138** dłużej wzmacniały obraz w MRI. Dawały one najlepsze rezultaty w kilka godzin po podaniu, podczas gdy Magnevist jest usuwany z organizmu w przeciągu kilkunastu minut. Krótki czas działania preparatu Magnevist sprawia, że badanie musi być wykonywane bezpośrednio po podaniu, a miejsce obrazowania określone wcześniej. W badaniach *in vivo* (model mysy, komórki RIF-1) wykonywanym w celu MRI wykazano, że dożylnie podanie związku **142** w ilości 10  $\mu\text{mol/kg}$  zwiększa kontrast rejestrowany dla guza o około 100% w 24 godziny po podaniu.

Dodatkowo wykazano użyteczność otrzymanych związków jako fotouczulaczy w PDT. W tym wypadku zastosowano znacznie mniejszą dawkę badanych związków (**134** i **138** – 0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ). Po 50 dniach od rozpoczęcia terapii 50% myszy było wolnych od guzów (RIF-1), które początkowo miały średnicę 4-6 mm. Z kolei, po 60 dniach od PDT

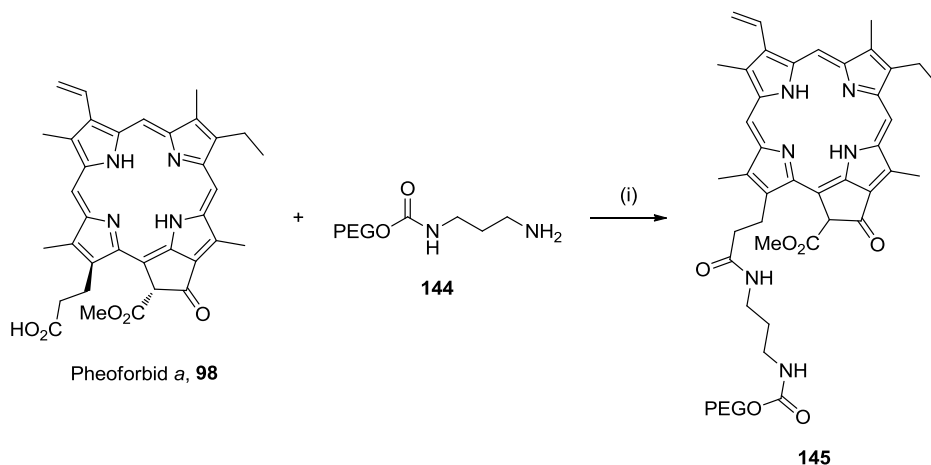
z wykorzystaniem związku **142**, w przypadku myszy obciążonych nowotworami RIF-1, 80% osobników była wolna od guzów, a w przypadku myszy z guzami Colon-26 odsetek ten wynosił około 50%.

Otrzymane pochodne sprawdziły się jako środki kontrastowe i w badaniach *in vivo* znacząco poprawiały obraz guzów. Związki te posiadają lepsze parametry farmakokinetyczne od dostępnych na rynku preparatów zawierających jony  $Gd^{3+}$ . Dodatkowym atutem otrzymanych pochodnych jest możliwość użycia ich jako fotouczulaczy i zastosowanie PDT bezpośrednio po wykonaniu badania MRI. Niestety, zwiększanie liczby jonów  $Gd^{3+}$  zmniejsza skuteczność związku jako fotouczulacza, dlatego do zastosowania jako związku dwufunkcyjne przyjęto za optymalną liczbę trzech jonów  $Gd^{3+}$ .

#### 2.3.1.4. Pozostałe modyfikacje chlorofilu

Przyłączanie łańcuchów poli(tlenku etylenu) (PEG) do związków biologicznie czynnych jest często stosowanym zabiegiem mającym na celu zwiększenie rozpuszczalności oraz poprawę ich właściwości farmakokinetycznych. Związki posiadające przyłączone łańcuchy PEG wykazują zwiększoną stabilność w badaniach *in vivo* oraz *in vitro*, dłużej utrzymują się w organizmie, co pozwala zmniejszyć częstość ich przyjmowania. Wprowadzanie łańcuchów PEG do cząsteczek nie powoduje zwiększenia toksyczności powstałych pochodnych.

Pierwsza synteza pochodnej chlorofilu z przyłączonymi łańcuchami PEG została opisana w 1996 roku.<sup>96</sup> Itoh ze współpracownikami przeprowadzili reakcję pheoforbid *a* **98** z  $\alpha$ -(3-aminopropyl)- $\omega$ -metoksypoli(oksyetylenem) (PEG-NH<sub>2</sub>) **144** w obecności EDC. (Schemat 32). Stwierdzono, że otrzymana pochodna, w przeciwieństwie do chlorofilu, rozpuszcza się w wodzie i jest bardziej stabilna. Związek ten został otrzymany z myślą



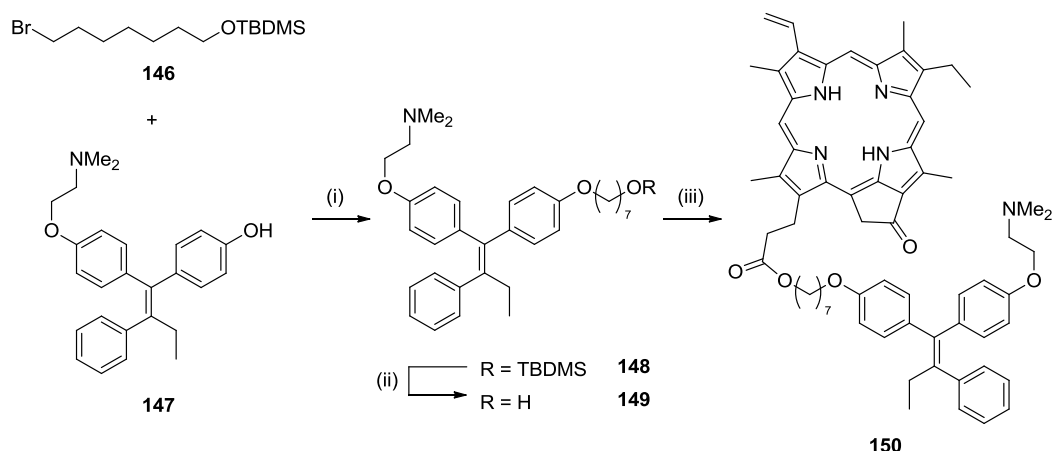
Schemat 32. Przyłączanie PEG do pheoforbidu *a* **98**. (i) EDC, HOBt, TEA, DCM, noc, 97%.

o zastosowaniu w PDT. Wykazano, że otrzymana pochodna generowała  $^1\text{O}_2$ , jednak nie przedstawiono żadnych badań biologicznych potwierdzających jej skuteczność. Dokładną charakterystykę związku **145** jak i szczegółowo syntezę oraz wyniki badań biologicznych opisał Xodo i współpracownicy.<sup>97,98</sup> Grupę karboksylową w pozycji 17 związku **98** zaktywowano EDC oraz HOBt, a następnie dodano polimer **144** (Schemat 32), otrzymując związek **145** z wydajnością 97%.

Badania biologiczne *in vitro* wykazały, że przyłączenie PEG wpływa niekorzystnie na transport do wnętrza komórek. Pochodna **145** była gorzej wchłaniana przez komórki niż Pheo *a*, co powodowało mniejszą fototoksyczność tego związku. Natomiast, badania farmakokinetyczne *in vivo* prowadzone na zdrowych osobnikach pokazały, że pochodna ta jest wchłaniana znacznie lepiej i jest usuwana prawie całkowicie z moczem w ciągu 48 godzin od podaniu. W przypadku myszy obciążonych nowotworami skóry zaobserwowano trzykrotnie większą akumulację w guzach związku **145** w porównaniu do Pheo *a*. Niestety nie przeprowadzono terapii potwierdzającej skuteczność otrzymanego związku jako fotouczulacza.

Kolejnym przykładem ciekawej modyfikacji pochodnych chlorofilu jest przyłączanie ich do znanych leków stosowanych w chemioterapii. W ten sposób planowano otrzymać nowe pochodne o znacznie lepszym powinowactwie do komórek nowotworowych, będące dodatkowo skutecznymi fotouczulaczami.

W 2006 roku Ray opisał połączenie pirophoeoforbidu *a* z tamoksyfenem – lekiem stosowanym w terapii raka sutka (Schemat 33).<sup>99</sup> Tamoksyfen wiąże się z receptorami estrogenowymi, których jest znacznie więcej w komórkach nowotworowych i hamuje ich wzrost oraz podział. Alkylowanie pochodnej tamoksyfenu **147** bromkiem **146** daje pochodną **148**,



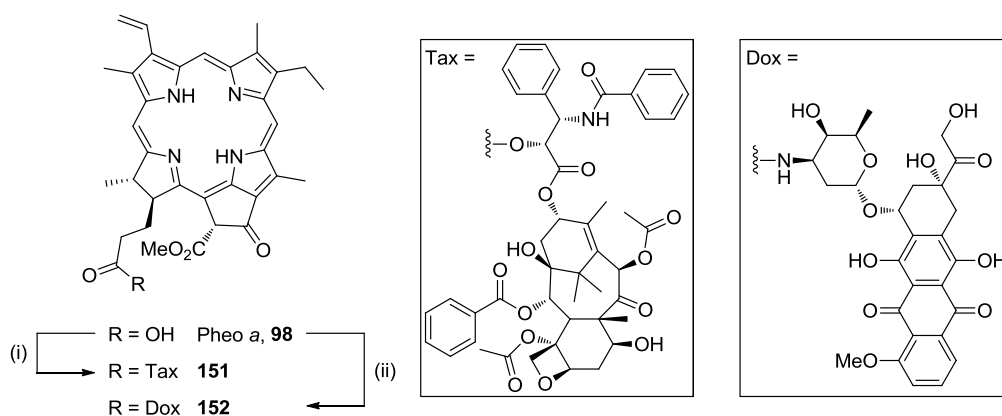
Schemat 33. Synteza połączenia tamoksyfenu z pirophoeoforbidem *a*. (i)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , KI, DMF, wrzenie; (ii) HF, MeCN; (iii) pirophoeoforbid *a* **98**, DCC, DMAP, DCM.



którą po usunięciu zabezpieczenia TBDMS poddano reakcji sprzęgania z pirophorbide *a* **98** w obecności DCC.

Związek **150** wykazywał silne powinowactwo do receptorów estrogenu  $\alpha$ , nie mniej jednak było ono mniejsze o około dwa rzędy wielkości od powinowactwa estrogenu. Następnie, porównano efektywność pochodnej **150** do wolnego pirophorbide *a* w PDT. W tym celu badane związki inkubowano z komórkami nowotworowymi MCF-7, a następnie poddano je działaniu światła czerwonego (630-780 nm). Po 16 godzinach od zakończenia naświetlania próbek inkubowanych z pirophorbide *a*, nieznaczny odsetek komórek uległ nekrozie. W przypadku analogicznego eksperymentu prowadzonego w obecności pochodnej **150** nekrozie uległo 85-90% komórek nowotworowych.

Inną pochodną przyłączoną do leków przeciwnowotworowych przedstawili badacze koreańscy. Kim, Ko i współpracownicy przyłączyli do pheorbide *a* (Pheo *a*) doksorubicynę i taxol.<sup>100</sup> Wykorzystano grupę karboksylową w pozycji 17 Pheo *a*, którą aktywowano EDC, a następnie sprzęgano z wolną grupą aminową doksorubicyny lub hydroksylową taxolu (Schemat 34). Wydajność reakcji sprzęgania wynosiła nieco ponad 50% w obu przypadkach.

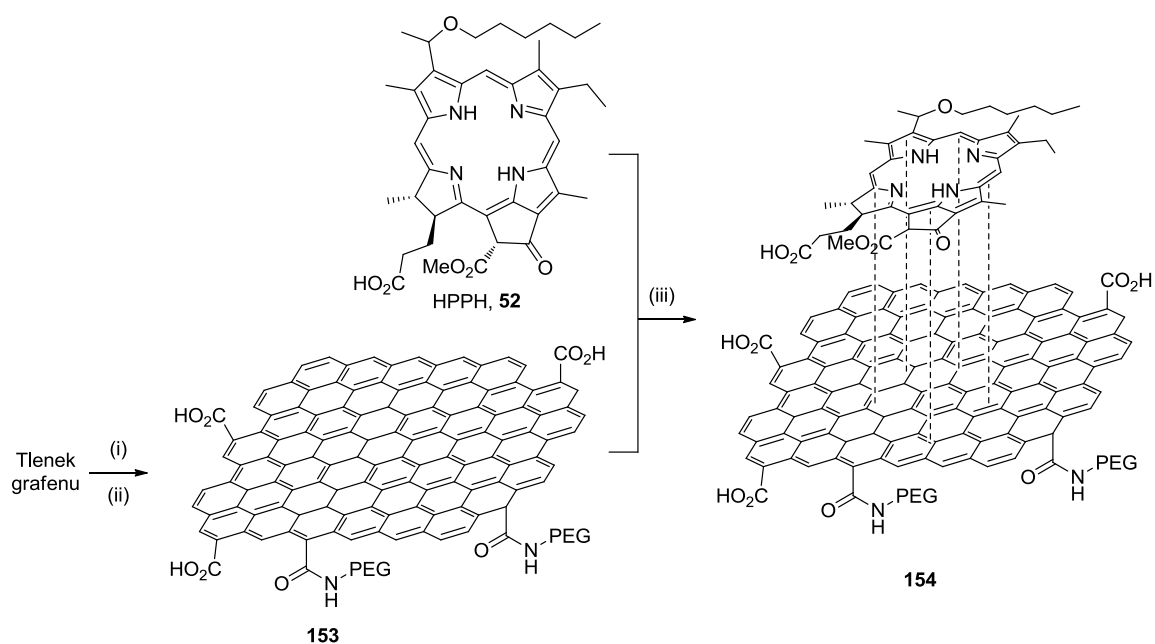


Schemat 34. Synteza połączeń pheorbide *a* **98** z lekami przeciwnowotworowymi. (i) Tax-H, EDC, DMAP, DCM, 4 godz., 54%; (ii) Dox-H, EDC, HOBt, TEA, DCM, DMF, 4 godz. 53%.

Badania *in vitro* otrzymanych pochodnych **151** i **152** prowadzone były na liniach komórek nowotworowych reprezentatywnych m.in. dla nowotworów piersi, szyjki macicy czy płuc (MCF-7, KB, HeLa, U-87MG, A549, AT-84, YD-10B). Otrzymane związki **151** i **152** inkubowano z komórkami bez dostępu światła i po trzech dniach szacowano ilość komórek, które przetrwały. Z badań tych wynika, że pochodna **152** była cytotoksyczna w średnim stopniu względem komórek MCF-7, HeLe, U-87MG oraz AT-84. Jednak w każdym przypadku dawała gorsze wyniki od niezwiązanej doksorubicyny. Z drugiej strony związek **151** wykazywał silne właściwości przeciwnowotworowe względem komórek MCF-7, HeLe, KB oraz YD-10. Brak jednak porównania wyników dla związku **151** z niezwiązanym

taxolem. Autorzy sugerowali, że różnice w aktywności pomiędzy otrzymanymi pochodnymi mogą wynikać z charakteru wiązania łączącego farmakofor z Pheo *a*. Wiązanie estrowe jest bardziej podatne na działanie enzymów wewnątrz komórki, dlatego w przypadku związku **151** łatwiej uwalniany jest taxol. Nie przedstawiono jednak żadnych badań dotyczących fototoksyczności otrzymanych pochodnych zaznaczając, że badania te są w toku.

Kolejnym zabiegiem mającym na celu polepszenie efektywności PDT było przyłączenie HPPH **52** do pochodnej grafenu.<sup>101</sup> Połączenie nanostruktury z fotouczulaczem miało na celu zwiększenie akumulacji w komórkach nowotworowych przy zachowaniu właściwości fotouczulających otrzymanego związku. Znane są bowiem podobne zastosowania grafenu jako nośników dla innych leków. Najpierw, tlenek grafenu zmodyfikowano przyłączając do niego łańcuchy PEG (Schemat 35). Następnie, na powierzchni otrzymanej pochodnej **153** osadzono cząsteczki HPPH **52** w oparciu o oddziaływanie typu  $\pi$ - $\pi$ . Fluorescencja grafenu **154** jest nieco słabsza w porównaniu do HPPH, co wiąże się z transferem energii stanu wzbudzonego pomiędzy układami aromatycznymi grafenu i HPPH. Skutkuje to niestety nieco mniejszą wydajnością kwantową generowania  $^1\text{O}_2$  przez otrzymany kompleks **154**.



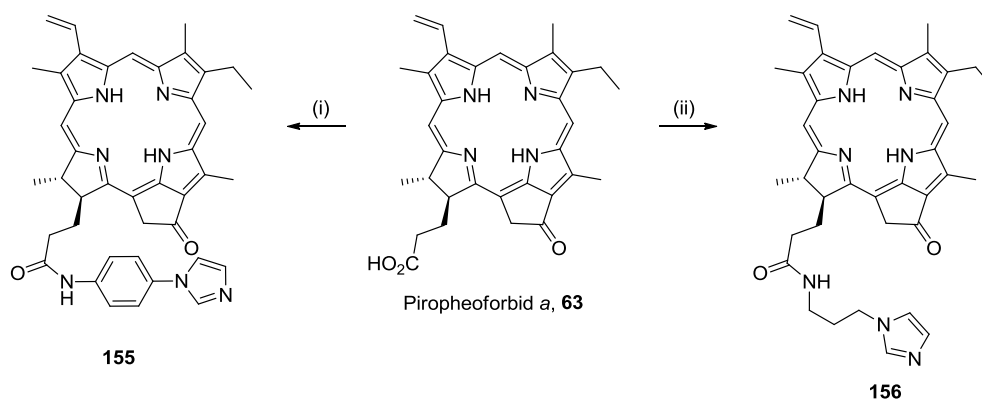
Schemat 35. Modyfikacja grafenu HPPH. (i) NaOH, 4 godz., 50 °C; (ii) EDC·HCl, PEG-NH<sub>2</sub>, noc; (iii) DMSO, noc.

Pochodną **154** poddano badaniom *in vitro* na komórkach raka piersi (4T1) oraz *in vivo* na myszach posiadających guzy tego typu. Naświetlanie prowadzono przy użyciu lasera o długości fali 671 nm. Co ciekawe, pomimo gorszych wyników fotofizycznych kompleksu **154** niż HPPH ten pierwszy był bardziej skuteczny w badaniach *in vitro*. Wy tłumaczono to zwiększoną akumulacją pochodnej **154**, która łatwiej wnikała do komórek. W badaniach *in*

*in vivo* przeprowadzonych na myszach, po podaniu związku **154** i naświetlaniu (671 nm) nowotwory uległy całkowitej ablacji. Terapia przy użyciu HPPH powodowała jedynie częściowe niszczenie guzów i przedłużenie życia myszy maksymalnie z 15 do 25 dni, natomiast grafenowa pochodna **154** pozwalała na całkowite wyleczenie około 40% myszy. Pomimo mało obiecujących wyników badań *in vitro* okazuje się, że zastosowanie grafenu jako nośnika wydatnie podnosi walory fotouczulacza w badaniach *in vivo*. Dużą zaletą tego podejścia wydaje się być sposób wiązania tetrapiroli do grafenu, który powinien być kompatybilny również dla innych podobnych tetrapiroli.

Ugrupowanie imidazolu często występuje w strukturze wielu leków. Na przykład, jego prosta pochodna, merkaptopuryna, jest lekiem stosowanym w terapii białaczek i chorób autoimmunologicznych. Jej działanie polega na zakłócaniu funkcjonowania DNA. Przyłączenie jednostki imidazolu w wielu przypadkach powoduje, że związki zyskują cechy przeciwbakteryjnych lub przeciwrzybiczych.

Ze względu na szerokie zastosowanie pochodnych imidazolu jako farmakoforów, Shim i współpracownicy przyłączyli dwie proste pochodne imidazolu do piropheoforbidu *a*, z nieokreślonych powodów, licząc na poprawę właściwości fototerapeutycznych powstałych pochodnych.<sup>102</sup> Związki **155** i **156** otrzymano w reakcji sprzęgania grupy aminowej pochodnej imidazolu z aktywowaną DCC grupą karboksylową piropheoforbidu *a* **63** (Schemat 36).

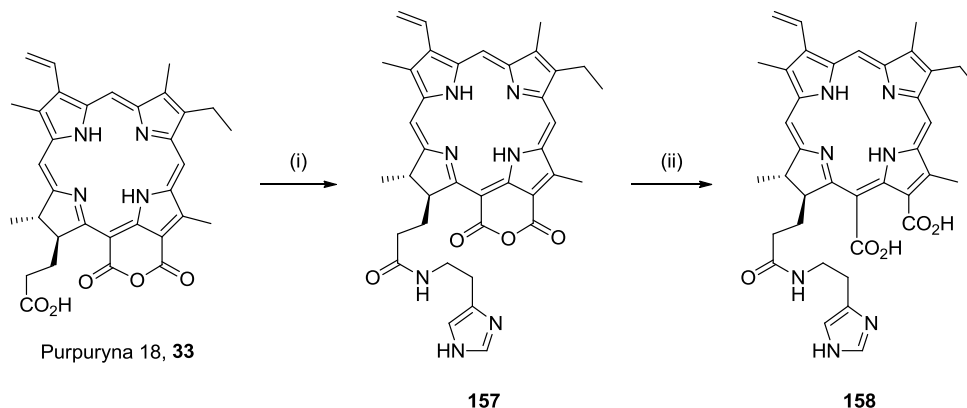


Schemat 36. Otrzymywanie połączeń piropheoforbidu *a* z imidazolem. (i) DCC, DMAP, 4-(1-imidazoilo)anilina, 57%; (ii) DCC, DMAP, 1-(3-aminopropyl)imidazol, 65%.

Badania *in vitro* prowadzono inkubując przez 24 godziny otrzymane pochodne **155** i **156** z komórkami nowotworu płuc A549. Następnie, poddano je działaniu światła o długości fali 670 nm. Stwierdzono, że działanie tych związków powoduje nekrozę około 90% komórek, dla wyjściowego piropheoforbidu *a* zaobserwowano nekrozę tylko około 50% komórek.

Z kolei Gupta i współpracownicy przyłączyli do innej pochodnej chlorofilu ( $Cp_6$ ) histaminę (Schemat 37).<sup>103</sup> Niektóre komórki nowotworowe produkują duże ilości histaminy

i są zdolne do regulacji namnażania się dzięki dużej ilości receptorów tej aminy na powierzchni komórek. Syntezę rozpoczęto od przyłączenia do purpuryny 18 histaminy, a następnie pierścień bezwodnika otwarto na drodze zasadowej hydrolizy, otrzymując zmodyfikowaną w pozycji 17 pochodną  $Cp_6$  **158**.



Schemat 37. Synteza pochodnej  $Cp_6$  z jednostką histydyny. (i) histydyna, EDC, DCM, 24 godz.; (ii) MeOH, NaOH.

Pochodna **158** słabiej niż  $Cp_6$  absorbowała światło, a molowy współczynnik ekstynkcji tego związku był o połowę niższy. Badania *in vitro* na dwóch liniach komórkowych nowotworu płaskonabłonkowego ust – 4Nt8e oraz 4451, wykazywały, że dzięki obecności receptorów histaminowych na powierzchni komórek nowotworowych, do wnętrza komórek przenikało 10-krotnie więcej fotouczulacza **158** niż  $Cp_6$ . Spowodowało to, znacznie lepsze właściwości fotouczulające otrzymanej pochodnej pomimo mniejszego o połowę molowego współczynnika ekstynkcji.

Połączenia pochodnych chlorofilu z pochodnymi imidazolu dają obiecujące wyniki w badaniach *in vitro*, niestety dotychczas nie przedstawiono wyników badań *in vivo*.

Połączenia fotouczulaczy z peptydami i białkami jest uznaną metodą zwiększania selektywności i efektywności w terapii fotodynamicznej. Związki te, dzięki specyficznym sekwencjom aminokwasów, są rozpoznawane przez komórki nowotworowe i bardzo często wykazują specyficzną akumulację, gromadząc się w wybranych obszarach komórek. Niewątpliwą zaletą tej metody jest możliwość przyłączenia do fotouczulacza sekwencji aminokwasów rozpoznawanej tylko przez jeden typ komórek nowotworowych, co powoduje bardzo dużą selektywność otrzymywanych połączeń. Metody przyłączania sekwencji aminokwasów oraz białek do naturalnych porfirynoidów zostały niedawno dobrze opisane przez Boyla i współpracowników.<sup>58</sup> Opisane reakcje są reprezentatywne dla metod wprowadzania białek i sekwencji aminokwasów w strukturę fotouczulaczy opartych na naturalnych porfirynoidach.

Kolejnym podejściem zastosowanym do stworzenia bardziej selektywnie akumulujących się fotouczulaczy jest przyłączanie przeciwciał monoklonalnych. Przeciwciała monoklonalne to otrzymane w wyniku biosyntezy białka, które wykazują specyficzne powinowactwo do jednego antygeny. Komórki nowotworowe wykazują często specyficzne powinowactwo do przeciwciał monoklonalnych. Tą cechą komórek nowotworowych wykorzystuje się tworząc połączenia m.in. pochodnych naturalnych porfirynoidów z przeciwciałami monoklonalnymi. Rezultaty badań biologicznych terapii fotodynamicznej prowadzonej przy użyciu połączeń porfirynoidów z przeciwciałami monoklonalnymi są bardzo obiecujące i dlatego sporo uwagi poświęca się rozwojowi tej koncepcji. Metody syntezy zastosowane do otrzymania takich połączeń opisał wyczerpująco Boyle i współpracownicy w 2011 roku.<sup>54</sup>

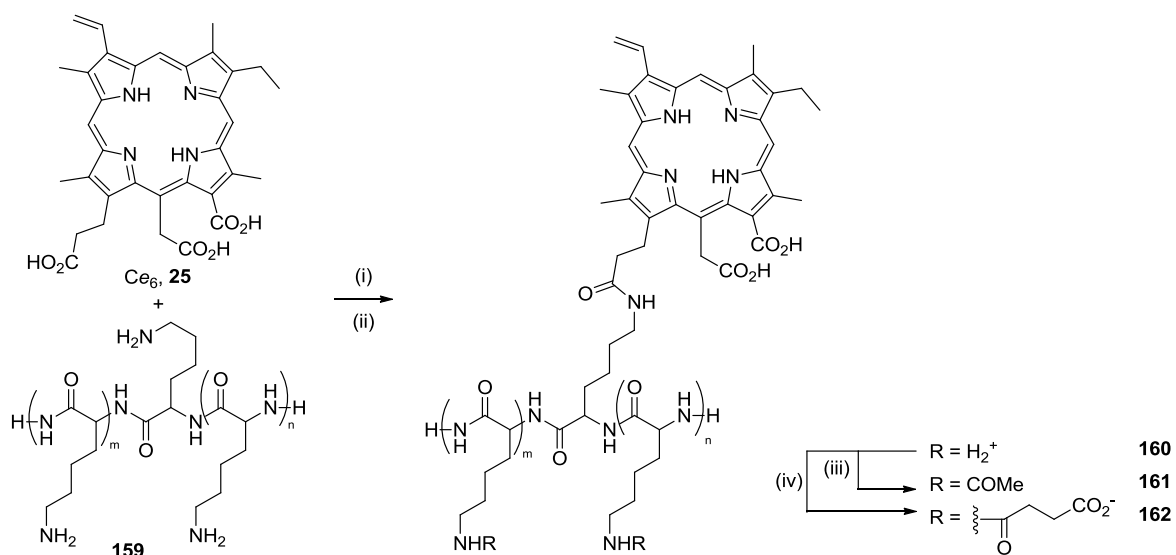
Bardzo ciekawą koncepcją nowoczesnych fotouczulaczy są tzw. fotouczulacze aktywowalne.<sup>53,104</sup> Koncepcja polega na syntezie dwóch chromoforów – aktywnego fotouczulacza i tzw. wygaszacza (*ang.* quencher) połączonych ze sobą w taki sposób, aby w procesie FRET fluorescencja oraz, co za tym idzie, zdolność do generowania  $^1\text{O}_2$  była wygaszona. Łącznik pomiędzy chromoforami powinien mieć takie właściwości, aby był rozpoznawany przez komórki nowotworowe i był w nich rozrywany. W tym celu stosuje się np. specyficzne peptydy<sup>105</sup> lub fragmenty mRNA.<sup>106</sup> Po degradacji łącznika fotouczulacz może odzyskać od wygaszacza na odległość, w której proces FRET nie zachodzi i w ten sposób zostaje aktywowany. Dodatkową zaletą jest obecność w komórkach dwóch różnych barwników, z których jeden może służyć jako fotouczulacz, a drugi być wykorzystany np. do obrazowania nowotworów. Synteza tego typu połączeń stosunkowo niedawno została opisana w artykułach przeglądowym i dlatego nie będzie dalej dyskutowana.<sup>53,104</sup>

W ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w PDT, co miało związek m.in. z otrzymaniem wielu nowych fotouczulaczy. Znaczną ich część stanowią pochodne chlorofili. Wśród modyfikacji dominują takie, które pomagają zwiększyć selektywność akumulacji w guzach oraz poprawiają właściwości farmakokinetyczne. Często wprowadzone modyfikacje powodowały pogorszenie właściwości fotofizycznych, co z kolei skutkowało nieco gorszymi wynikami w badaniach *in vitro*. Jednakże, poprawa właściwości farmakokinetycznych prowadziła do znacznie lepszych wyników PDT w badaniach *in vivo*. O zainteresowaniu pochodnymi chlorofilu jako fotouczulaczami w PDT świadczy stale zwiększająca się liczba publikacji. Niestety, jak do tej pory brak jest doniesień na temat wprowadzenia fotouczulaczy trzeciej generacji do badań klinicznych.

### 2.3.1.5. Pochodne chlorofilu o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych.

Metodologia PDT nie ogranicza się do leczenia nowotworów. Coraz częściej próbuje się ją wykorzystać do walki z infekcjami bakteryjnymi, wirusowymi oraz grzybiczymi. Większość badań dotyczących użycia PDT przeciw drobnoustrojom prowadzona jest w oparciu o syntetyczne porfiryny posiadające czwartorzędowe grupy aminowe,<sup>107-111</sup> ponieważ wykazano, że związki w postaci odpowiednich soli łatwiej przechodzą przez ścianę komórkową mikroorganizmów. Metodologia ta może być wykorzystana tylko w leczeniu infekcji miejscowych, ale jej zaletą jest to, że w przeciwieństwie do antybiotykoterapii bakterie nie mogą zbudować odporności na fototerapię.

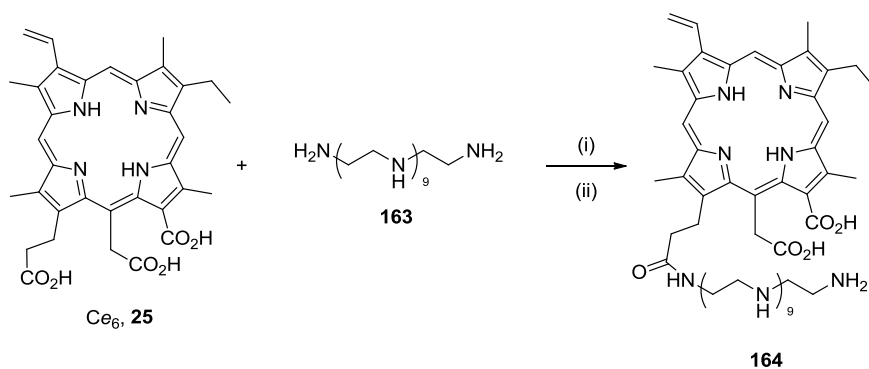
Pierwszą pochodną chlorofilu o właściwościach przeciwbakteryjnych otrzymano w zespole Hamblina przyłączając do  $Ce_6$  jednostkę poli-L-lizyny (Schemat 38).<sup>112</sup> Otrzymany związek **160** wydzielano na drodze dializy i po zobojętnieniu  $Ac_2O$  otrzymano pochodną **161**. Z kolei potraktowanie związku **160** bezwodnikiem bursztynowym prowadziło do powstania anionowej pochodnej **162**.



Schemat 38. Przyłączanie poli-L-lizyny do  $Ce_6$ . (i) DCC, NHS, DMSO, 24 godz.; (ii) bromowodorek poli-L-lizyny, *N*-metylomorfolina, 24 godz.; (iii) bezwodnik octowy; (iv) bezwodnik bursztynowy.

Pierwsze badania biologiczne pochodnych **160-162** prowadzono na bakteriach gram dodatnich (*Actinomyces viscosus*) oraz gram ujemnych (*Porphyromonas gingivalis*) będących częstą przyczyną infekcji jamy ustnej.<sup>113</sup> Bakterie inkubowano w ciemności z fotouczulaczem przez minutę, a następnie naświetlano światłem o długości fali 671 nm przez 10 minut. W przypadku *P. gingivalis* śmiertelność bakterii wynosiła 99%, 91% i 76% odpowiednio dla związków **160**, **161** i **162**. Najskuteczniejsza, kationowa pochodna **160**, powodowała nekrozę bakterii *A. viscosus*, przy czym komórki nabłonka jamy ustnej (HCPC-1) pozostały

nienaruszone. Dowodzi to celowości terapii, która niszczy bakterie występujące w jamie ustnej oszczędzając nabłonek. W takich samych warunkach Verteporfin nie naruszał bakterii *P. gingivalis*, stwierdzono natomiast nekrozę komórek nabłonka. Następnie, porównano skuteczność pochodnej **160** z innymi barwnikami: błękitem toluidynowym O (toluidyne blue O - TBO) oraz różem bengalskim (bengal rose - BR) w badaniach na bakteriach gram dodatnich gronkowca złocistego (*S. aureus*), gram ujemnych *Escherichia coli* oraz drożdżach *Candida albicans*. Związek **160** skutecznie wnikał do wszystkich badanych mikroorganizmów. Natomiast TBO oraz BR wnikają do komórek w tylko niewielkim stopniu, głównie łącząc się ze ścianą komórkową i ich działanie opiera się głównie na niszczeniu tej struktury komórkowej. Istotną wadą pochodnej **160** jest jej degradacja w obecności proteaz, które powodują rozrywanie wiązań amidowych poli-L-lizyny. Rozwiązaniem tego problemu okazało się zastąpienie łańcuchów poli-L-lizyny ugrupowaniem polietylenoiminy (PEI) (Schemat 39).<sup>114</sup> Te ostatnie mogą mieć strukturę polimeru liniowego lub rozgałęzionego. Do syntezy pochodnych zastosowano trzy polimery: liniowy o stopniu polimeryzacji 10 (PEI liniowa), rozgałęziony o średniej liczbowo masie cząsteczkowej  $M_n = 600$  oraz rozgałęziony o  $M_n = 10000$ . Odpowiednią polietylenoiminę rozpuszczono w DMSO i dodano  $Ce_6$ , EDC·HCl oraz TEA. Wydajność reakcji nie została podana, a otrzymane produkty scharakteryzowano jedynie za pomocą widm UV/Vis oraz analizą HPLC.



Schemat 39. Przyłączanie polietylenoiminy do  $Ce_6$  na przykładzie liniowej PEI. (i) EDC, TEA, DMSO, 24 godz.

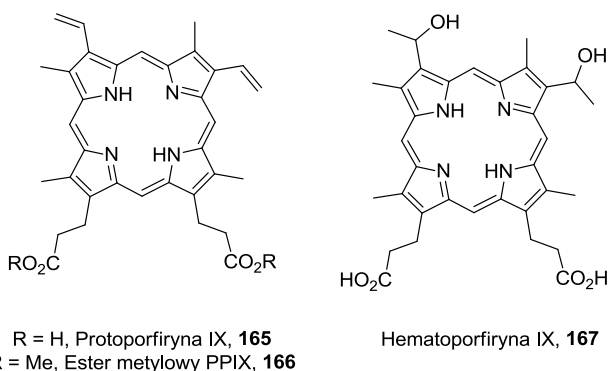
Zdolność do niszczenia mikroorganizmów przez otrzymane pochodne pod wpływem światła przetestowano na bakteriach gram dodatnich (*S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*), gram ujemnych (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) oraz drożdżach (*C. albicans*). Fotouczulacze inkubowano bez dostępu światła z wybranym patogenem przez 10 minut, a następnie przemyte buforem próbki wystawiano na działanie światła laserowego o długości fali 665 nm. Największą efektywność wykazała pochodna z przyłączoną polietylenoiminą o  $M_n = 10000$ , która skutecznie niszczyła wszystkie testowane mikroorganizmy. Pochodna **164** była wyraźnie mniej skuteczna wobec gram ujemnych bakterii, a najslabsze wyniki terapii

fotodynamicznej zanotowano dla pochodnej z przyłączoną polietylenoiminą o  $M_n = 600$ . Powód nie został podany, wiadomo jednak, że niska aktywność tego związku nie wynikała ze słabszego wchłaniania ani z mniejszej wydajności generowania  $^1O_2$ . Ponadto, wszystkie otrzymane związki wykazywały większą stabilność w porównaniu z pochodną **160**, co więcej nie ulegały one degradacji pod wpływem proteaz. Dla związku z przyłączoną polietylenoiminą o  $M_n = 10000$  przeprowadzono dodatkowe badania na drożdżach *Cryptococcus neoformans* wywołujących grzybicę,<sup>115</sup> które są trudne do wyleczenia ze względu na grubą otoczkę polisacharydową utrudniającą wnikanie wielu antybiotyków. Udowodniono, że fototerapia z zastosowaniem tego związku powoduje naruszenie struktury otoczki, co w konsekwencji ułatwia wchłanianie fotouczulacza i skuteczną terapię.

W przypadku zastosowania terapii fotodynamicznej bakterie nie mogą w prosty sposób uodpornić się na jej działanie. Zastosowanie terapii fotodynamicznej do leczenia infekcji bakteryjnych i grzybiczych może stać się zatem doskonałym uzupełnieniem antybiotykoterapii, która coraz częściej boryka się z problemem szczepów bakterii opornych na działanie antybiotyków. Należy jednak pamiętać, o ograniczeniach tej terapii jedynie do infekcji zlokalizowanych. Dotychczas przeprowadzone badania dostarczają dużo pozytywnych rezultatów. Metodologia ta wymaga jednak dopracowania, stąd w najbliższej przyszłości spodziewana jest kontynuacja badań w tym temacie.

### 2.3.2. Modyfikacje hemu

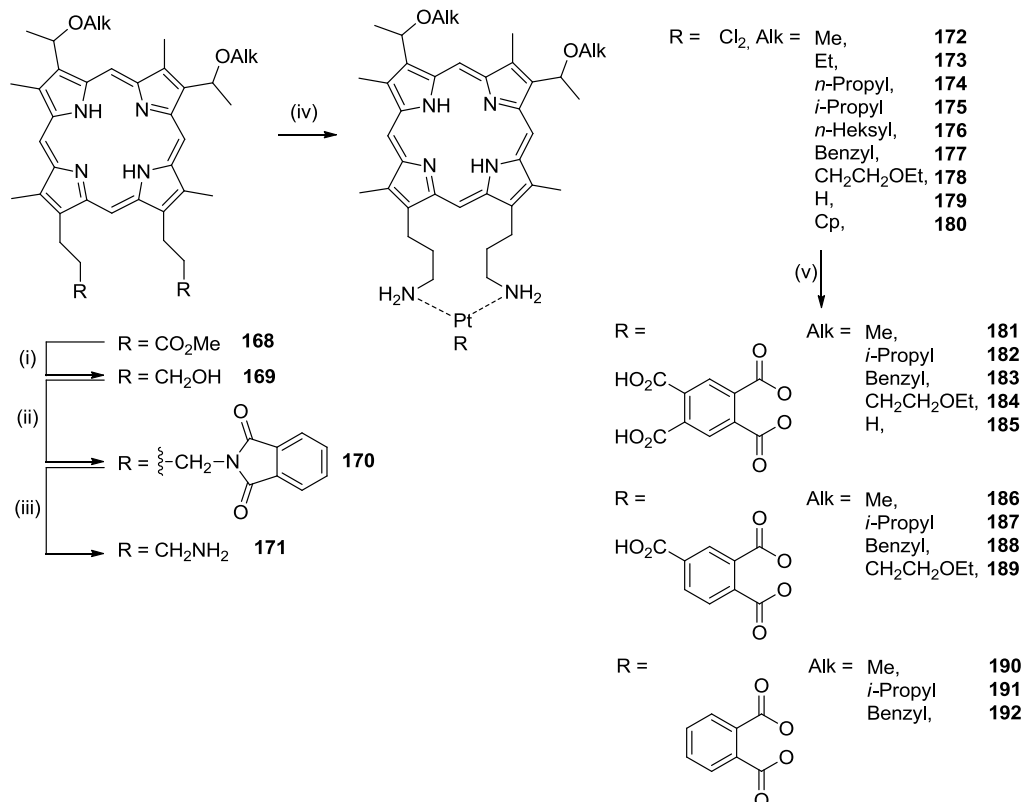
Związkiem, który został wykorzystany do syntezy pierwszego stosowanego klinicznie fotouczulacza (Photofrin<sup>®</sup>) jest pochodna hemu – hematoporfiryna. W późniejszym czasie próbowano zastosować inne pochodne hemu, zwłaszcza protoporfirynę IX **165** (PPIX), jej ester metylowy **166** lub hematoporfirynę IX **167** (HPIX) do celów PDT (Rysunek 12). Ponadto, PPIX **165** jest otrzymywana wewnątrz komórek z kwasu 5-aminolewulinowego.



Rysunek 12. Pochodne hemu.



Wykorzystuje się tą właściwość i jako prekursor tego kwasu podaje się jego estry (Levulan, Metvix), co skutkuje nagromadzeniem się PPIX w komórkach nowotworowych w ilości pozwalającej na skuteczną fototerapię. Ta koncepcja wykorzystywana jest np. w leczeniu raka skóry.<sup>50</sup> Badania nad pochodnymi hemu do celów PDT opisał Dolphin,<sup>48</sup> a następnie van Lier<sup>116</sup> oraz Pavlov.<sup>117</sup>

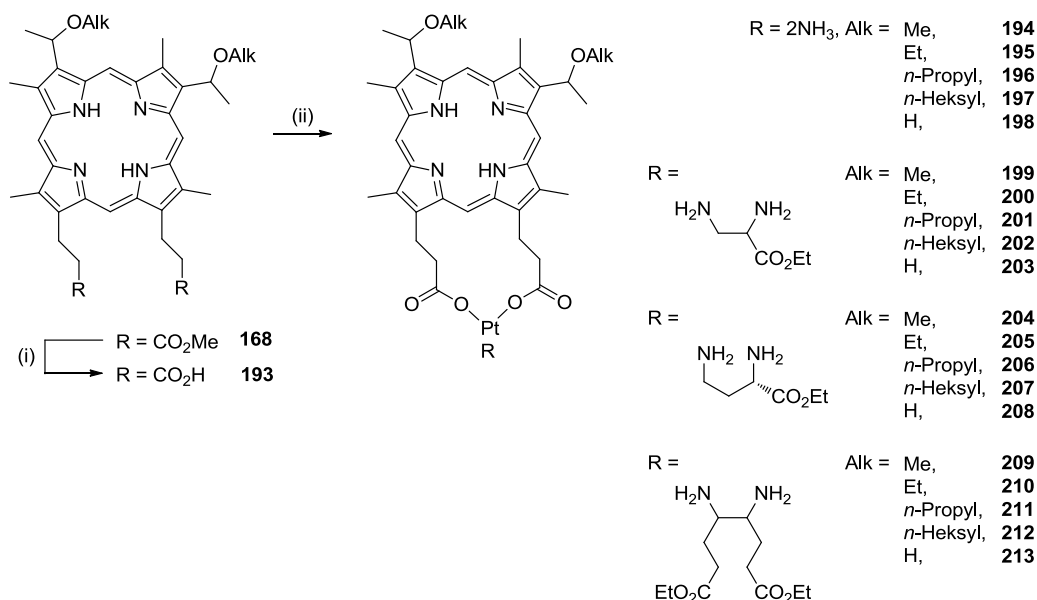


Schemat 40. Synteza platynowych pochodnych **172-192** PPIX. (i) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 10 godz.; (ii) PPh<sub>3</sub>, ftalimid, DEAD, THF, 2 dni; (iii) hydrazyna, THF, wrzenie, 2 dni; (iv) K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, THF, HCl, 8 godz.; (v) AgNO<sub>3</sub>, HNO<sub>3</sub>, 7 dni, następnie NaOH, RH<sub>2</sub>, 3 dni.

Brunner i współpracownicy połączyli struktury PPIX oraz *cis*-platyny.<sup>118-121</sup> Modyfikacja ta miała na celu otrzymanie związku o właściwościach przeciwnowotworowych zarówno w obecności, jak i bez dostępu światła. Związki te posiadały ugrupowanie *cis*-Pt(II) przyłączone do cząsteczki porfiryny w pozycji 13 i 17 albo przez dwie grupy aminowe **172-192** (Schemat 40), albo karboksylowe **194-213** (Schemat 41).

W tym pierwszym przypadku grupy estrowe w pozycjach 13 i 17 w porfirynach **168** redukuje się do odpowiednich dioli **169** glinowodorkiem litu. Następnie, w reakcji Mitsunobu wymieniono grupy hydroksylowe na ftalimidowe, które w reakcji z hydrazyną przekształcono w grupy aminowe. Tak otrzymane diaminy **171** poddano reakcji z K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>, otrzymując kompleksy porfiryny z PtCl<sub>2</sub> (**172-180**). Następnie, usunięto atomy chloru w reakcji z azotanem srebra(I), a powstałe związki pośrednie poddano reakcji z kwasami ftalowymi otrzymując pożądane kompleksy **181-192**. W przypadku otrzymywania kompleksów

*cis*-Pt(II) połączonych z PPIX grupami karboksylowymi synteza potrzebnych porfiryn była prostsza (Schemat 41). Wyjściowe estry **168** poddano reakcji hydrolizy w warunkach zasadowych (KOH/MeOH) otrzymując pożądaną dikwasę **193**. Następnie, diaminowe kompleksy PtI<sub>2</sub> poddawano reakcji z azotanem srebra(I) i dodawano dikwasów **193**, otrzymując w ten sposób serię kleszczowych pochodnych **194-213**.

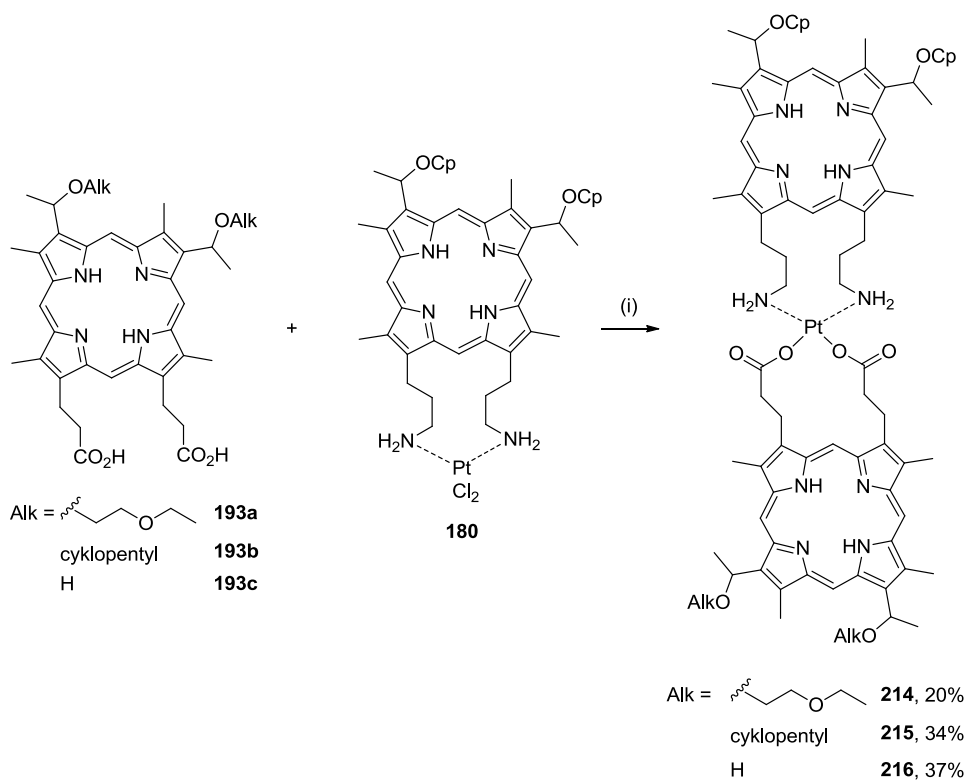


Schemat 41. Synteza platynowych pochodnych **194-213** PPIX. (i) KOH, MeOH, 2 godz.; (ii) I<sub>2</sub>PtR, AgNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 7 dni, następnie porfiryne, EtOH, THF, kilka dni.

W badaniach *in vitro* wszystkie pochodne wykazywały toksyczność zarówno w ciemności jak i po naświetleniu. Wartości te najczęściej nie odbiegały znacząco od tych zmierzonych dla *cis*-platyny. Najlepsze wyniki otrzymano w przypadku pochodnych diaminowych porfiryn **181-192**. Wszystkie z nich posiadały wysoką fototoksyczność. Z kolei bez naświetlania jedynie związki posiadające ligand ftalowy **190-192** posiadały nieco gorsze właściwości.

W tej samej grupie otrzymano również diporfirynowe pochodne *cis*-platyny (Schemat 42).<sup>122</sup> Związki **214-216** otrzymywano w wyniku reakcji dikwasów **193a-c** z kompleksem **180**. Otrzymane pochodne **214-216** w badaniach *in vitro* wykazywały wysoką fototoksyczność. Niestety, w ciemności aktywna była tylko pochodna **215**.

Większość z otrzymanych pochodnych *cis*-platyny posiadała założone przez badaczy właściwości. Niestety, nie przedstawiono badań *in vivo* otrzymanych związków, stąd trudno ocenić ich właściwy potencjał.

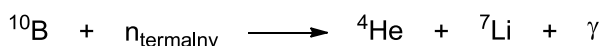


Schemat 42. Diporfirynowa pochodna *cis*-platyny. (i) DMSO, THF, 48 godz.

Przykładów potencjalnych fotouczulaczy trzeciej generacji otrzymywanych z hemu w porównaniu z pochodnymi chlorofilu jest znacznie mniej. Na przyczyny takiego stanu rzeczy składa się najprawdopodobniej kilka czynników. 1) Chloryny i bakteriochloryny absorbują światło o dłuższych falach, dzięki czemu bardziej odpowiadają wymogom tzw. „okienka biologicznego”. 2) Obecnie częściej wybieraną drogą, jest synteza porfiryny *de novo* (najczęściej pochodnej tetrafenyloporfiryny), niż modyfikacja naturalnej PPIX czy innej pochodnej hemu. Syntetyczne porfiryny, jak również chloryny i bakteriochloryny, są obiektem intensywnych badań jako fotouczulaczy do PDT. 3) Właściwości farmakokinetyczne syntetycznych porfiryn, chloryn i bakteriochloryn są dobre, przykładem może być Foscan – prosta syntetyczna chloryna stosowana klinicznie jako fotouczulacz w terapii nowotworów głowy i szyi.<sup>50</sup>

## 2.4. Terapia borowo-neutronowa

BNCT (*ang.* – Boron Neutron Capture Therapy) jest akronimem angielskiej nazwy nowoczesnej metody radioterapii wykorzystującej związek boru.<sup>123</sup> Terapia borowo-neutronowa polega na wprowadzeniu do komórek nowotworu związków boru, a następnie napromieniowaniu całej tkanki tzw. neutronami termalnymi o niskiej energii.<sup>12,123-127</sup> Neutrony wychwytywane przez atomy boru powodują reakcję rozpadu naturalnego izotopu <sup>10</sup>B (Schemat 43).



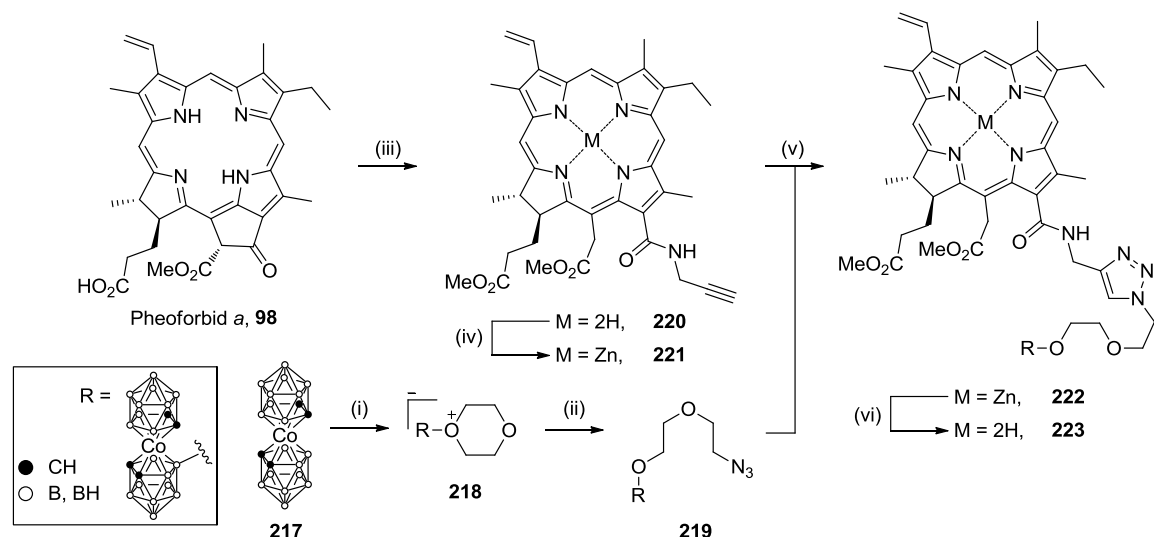
Schemat 43. Rozpad izotopu  $^{10}\text{B}$  pod wpływem neutronów termalnych.

Produkty tej reakcji jądrowej posiadają dużą energię kinetyczną, która rozpraszając się np. na sposób ciepła powoduje zniszczenie tkanki.<sup>128</sup> Zasięg terapeutyczny powstałych cząstek sięga około 10  $\mu\text{m}$ , tak więc efekt obserwuje się w miejscu, w którym występuje największe stężenie atomów boru.<sup>123</sup> Zatem, skuteczne działanie BNCT wymaga selektywnego dostarczenia jak największej ilości atomów boru do komórek nowotworowych. Związki wykorzystywane do BNCT są pochodnymi wyższych borowodorów i w porównaniu do najprostszych związków tego typu są stabilne. Ponadto, posiadają dużą ilość atomów boru w cząsteczce. Przyłącza się do nich związki selektywnie akumulujące się w nowotworach, wśród których znajdują się również pochodne chlorofili i hemu.

Metoda ta, ma największe szanse na wprowadzenie do praktyki medycznej w przypadku nieoperowalnych nowotworów mózgu np. glejaków, chociaż jak każda inna, ma swoje wady. Stosunkowo duża ilość atomów boru musi zostać selektywnie zlokalizowana w komórkach nowotworowych, ponieważ izotop  $^{10}\text{B}$  występuje w naturze w ilości około 20%. Potrzebna wiązka neutronów o odpowiedniej charakterystyce nie jest łatwa do otrzymania i wymaga zastosowania filtrów eliminujących inne rodzaje promieniowania. Jest to więc metoda droga i bardzo zaawansowana technologicznie, jednak dotychczasowe wyniki badań pokazują, że szybko rozwijają się wszystkie aspekty potrzebne do skutecznego zastosowania tej metody na szeroką skalę w bliskiej przyszłości.<sup>12</sup>

#### 2.4.1. Pochodne chlorofilu w BNCT

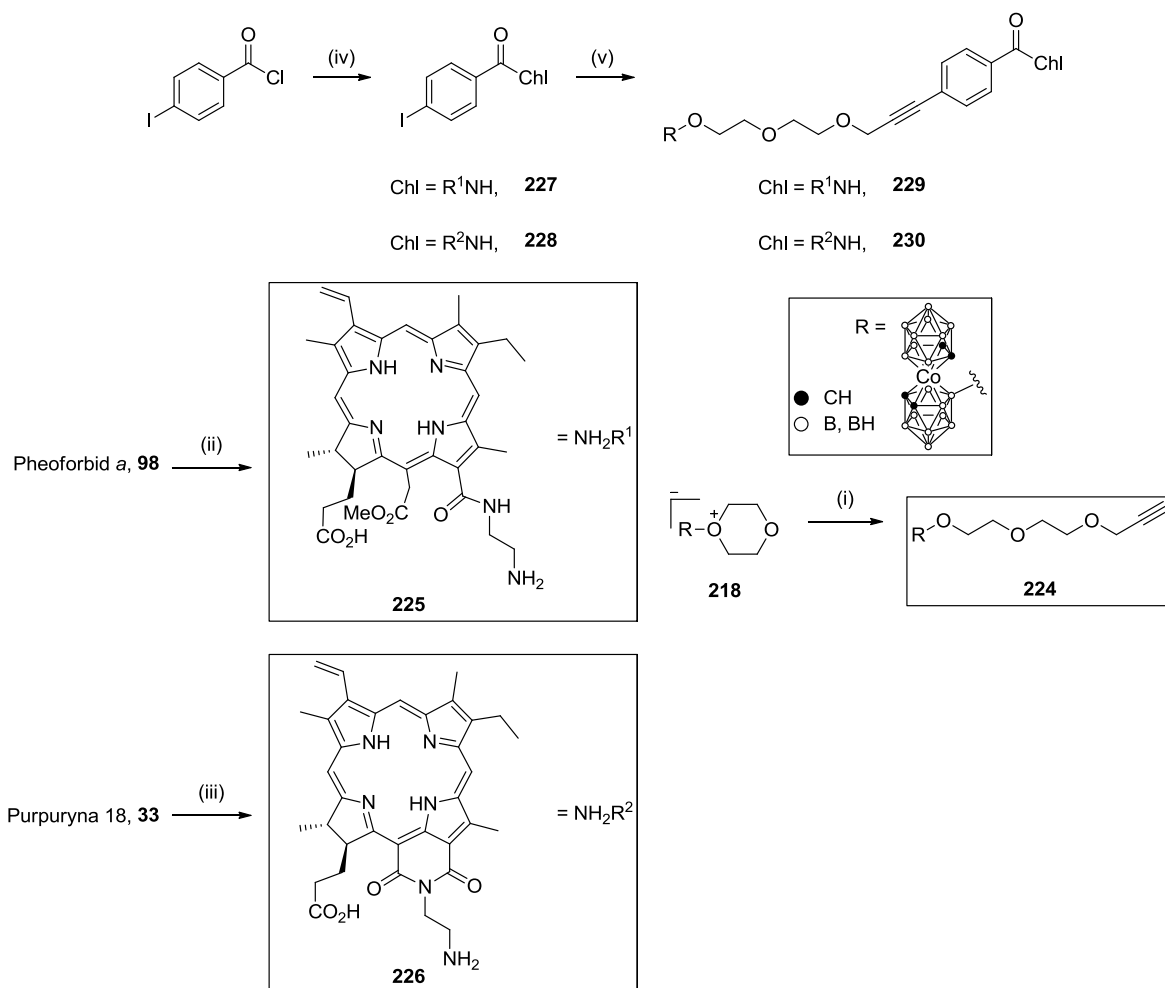
Badania nad przyłączaniem boranów do pochodnych chlorofilu prowadzono w grupie Mironova.<sup>128-131</sup> Kluczową reakcją użytą do jednej z modyfikacji chlorofilu była katalizowana solami miedzi cykloaddycja azydków do alkinów (CuAAC).<sup>132</sup> Odpowiedni azydek **219** otrzymano według procedury opisanej przez Kononova.<sup>133</sup> Bis(dikarbollid) kobaltu **217** poddano reakcji z 1,4-dioksanem w THF (Schemat 44). Otrzymana sól **218** łatwo ulega substytucji nukleofilowej w reakcji z  $\text{Bu}_4\text{NN}_3$  dając pochodną **219**. Z kolei chlorynę **220** otrzymano z pheoforbidu **98** w reakcji z propargiloaminą. Następnie po utworzeniu kompleksu cynku **221**, poddano go reakcji z azydkiem **219** w obecności jodku miedzi(I). Użycie cynkowanej pochodnej jako substratu wyeliminowało problem niepożądaną (ze względu na trudności w późniejszym jej usunięciu) insercji jonu miedzi(II) do luki makrocyclicznej.



Schemat 44. Otrzymywanie borowodorowych pochodnych chlorofilu w reakcji CuAAC. (i) 1,4-dioksan, THF; (ii)  $\text{Bu}_4\text{NN}_3$ , DCM, 24 godz., 92%; (iii) propargiloamina, DCM, 86%; (iv)  $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CHCl}_3$ , MeOH; (v) CuI, DIPEA, MeCN, 3.5 godz., 68%; (vi) HCl 6M.

Inne pochodne chlorofilu otrzymano w reakcji Sonogashiry (Schemat 45).<sup>134</sup> Odpowiedni blok budulcowy – alkin **224** otrzymano w analogiczny sposób do syntezy azydku **219**, przy czym jako nukleofila użyto zdeprotonowanego alkoholu propargilowego. Odpowiednie pochodne chlorofilu otrzymano w reakcji pheoforbidu *a* **98** i purpuryny 18 **33** z 1,2-diaminoetanem. Pochodne te poddano następnie reakcji z chlorkiem kwasu *p*-jodobenzoowego. Zsyntetyzowane związki **227** i **228** posiadały w swej strukturze ugrupowanie jodoarylowe, które ulegało reakcji z alkinem **224** w obecności  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (60-68%).

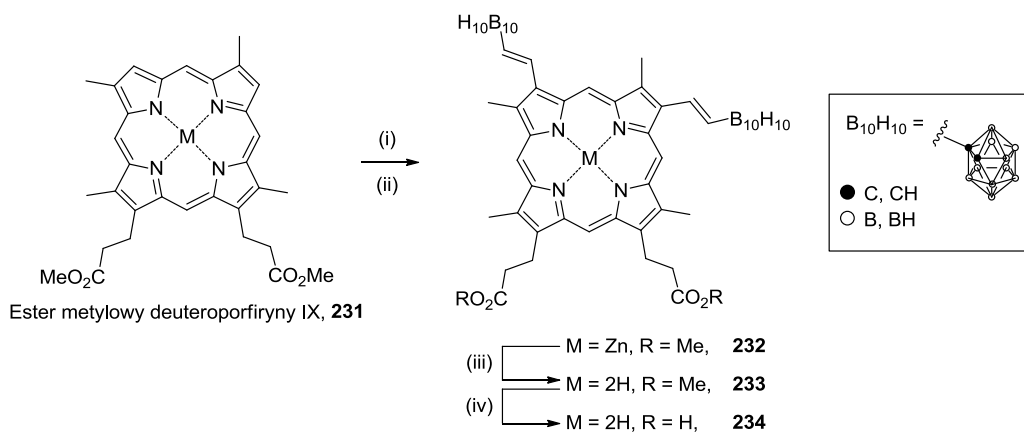
Badania *in vitro* wykazały, że związki **223**, **229** i **230** są wchłaniane przez komórki raka płuc A549 i gromadzą się w cytoplazmie. Nie mają jednak powinowactwa do błon komórkowych. Rozproszenie leku w cytoplazmie nie jest korzystne z terapeutycznego punktu widzenia, dlatego też nie sprawdzono skuteczności zsyntetyzowanych pochodnych w terapii borowo-neutronowej. Ponadto, związki te nie są toksyczne w ciemności i nie powodują nekrozy komórek po naświetleniu.



Schemat 45. Otrzymywanie boranowych pochodnych chlorofili z wykorzystaniem reakcji Sonogashiry. (i) propargilan sodu, MeCN, 0 °C, 48 godz, 95%; (ii) etylenodiamina; CHCl<sub>3</sub>, 3 godz.; (iii) H<sub>2</sub>O, H<sup>+</sup>, następnie etylenodiamina, DCC, DMAP, THF, 75%; (iv) R<sup>1</sup>NH<sub>2</sub> lub R<sup>2</sup>NH<sub>2</sub>, DIPEA, DCM, 1 godz., 79-83%; (v) **224**, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, PPh<sub>3</sub>, DIPEA, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, 60 °C, 48 godz., 60-68%.

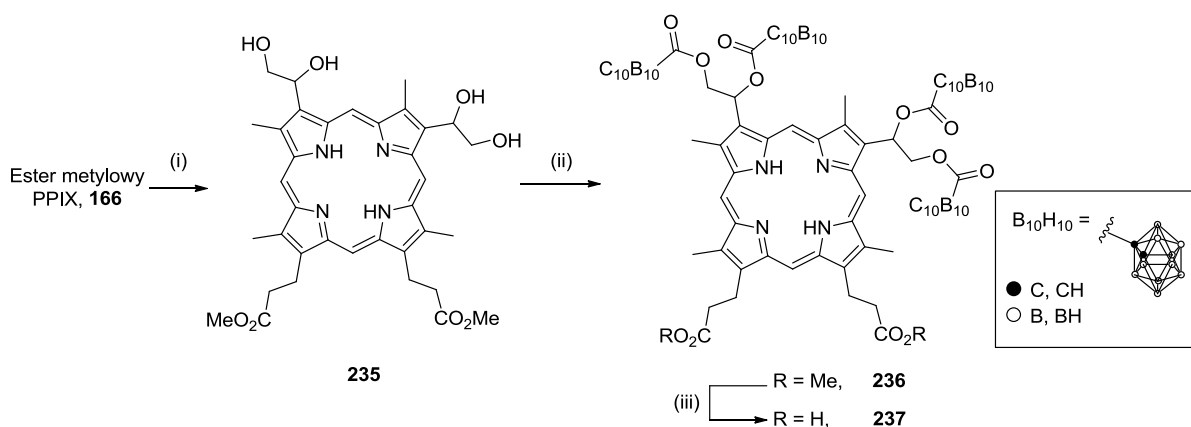
#### 2.4.2. Pochodne PPIX w BNCT

Innymi związkami tetrapirołowymi modyfikowanymi w celu zastosowania w BNCT były pochodne hemu. Pierwsze prace dotyczące przyłączania do nich boranów sięgają początku lat 90-tych.<sup>135</sup> Ester metylowy deuteroporfiryny IX **231**, w reakcji z HgCl<sub>2</sub> przekształcono w związek rtęcioorganiczny, który ulegał reakcji z winylodekaboranem w obecności soli palladu dając związek **232** (42%) (Schemat 46). Następnie, przy użyciu TFA usunięto jon cynku z luki makrocyklicznej, a grupy estrowe poddano hydrolizie otrzymując pochodną **234**. Niestety, nie przedstawiono wyników badań biologicznych.



Schemat 46. Synteza dekaborowanej pochodnej PPIX. (i)  $\text{HgCl}_2$ ; (ii) winylodekaboran,  $\text{LiPdCl}_3$ ; (iii) TFA; (iv) KOH, MeOH, THF,  $\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 godz., wrzenie.

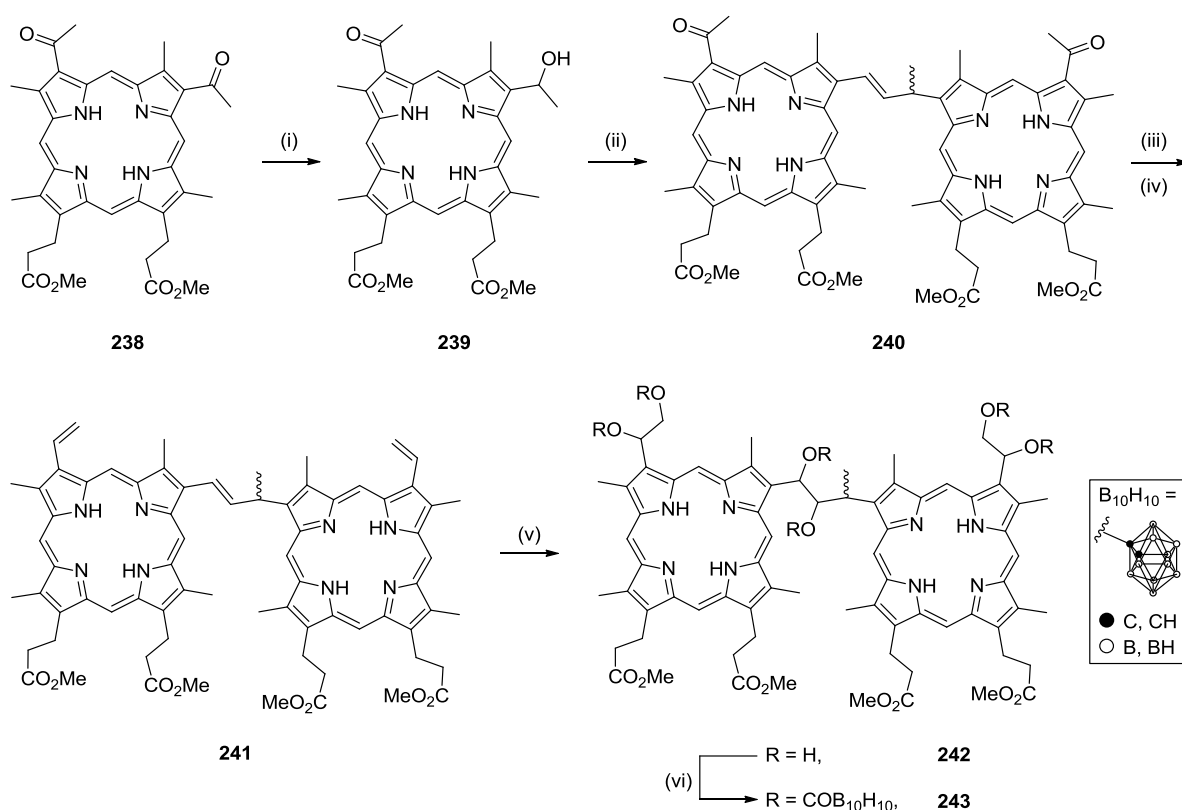
Z kolei Kahl wychodząc z porfiryny **235** wprowadził od razu cztery ugrupowania dekaboranu.<sup>136</sup> W pierwszym etapie ester metylowy PPIX **166** poddano reakcji dihydroksylacji (Schemat 47).<sup>137,138</sup> Otrzymany diol **235** reagował z odpowiednim chlorkiem kwasowym dekaboranu dając porfiryne **236** z wydajnością 85%. Następnie, selektywna hydroliza (złóże Dowex-50 w formie  $\text{K}^+$ ) pozwoliła na otrzymanie rozpuszczalnego w wodzie dikwasu **237**, nazywanego również BOPP (*ang.* BOPP – boronated protoporphyrin). Skuteczność BOPP jako leku w terapii borowo-neutronowej raka tarczycy została przebadana na modelu mysim przez grupę Pisareva.<sup>12,139</sup> Okazało się, że w badaniach *in vivo* związek ten wykazuje słabą selektywność wchłaniania, komórki nowotworowe pobierały tylko dwa razy więcej BOPP niż zdrowe komórki. Wykazano jednak, że napromieniowanie myszy posiadających guzy raka tarczycy, którym podano BOPP, powoduje całkowitą remisję guzów. W przypadku grupy kontrolnej pod wpływem napromieniowania wiązką neutronów zaobserwowano nieznaczne zmniejszenie się guzów. Jak do tej pory są to jedyne wyniki badań *in vivo* przeprowadzone z wykorzystaniem borowych pochodnych naturalnych tetrapiroli.



Schemat 47. Synteza pochodnej **237**. (i)  $\text{OsO}_4$ , pirydyna, 45 min.; (ii)  $\text{B}_{10}\text{H}_{10}\text{COCl}$ , DMAP, DCM, 85%; (iii)  $\text{K}^+$  Dowex-50, THF,  $\text{H}_2\text{O}$ .

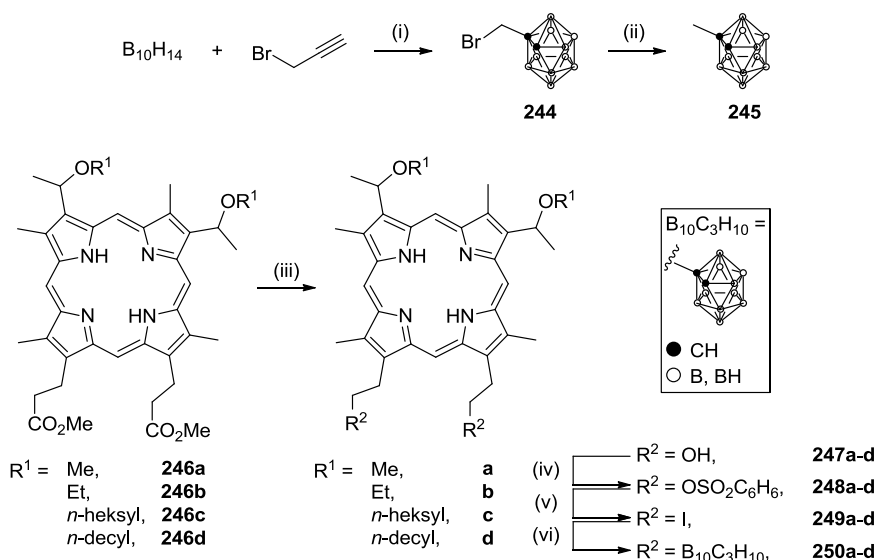
W toku dalszych badań, otrzymano związki o strukturze dimerycznej posiadającej sześć ugrupowań borowodorowych (Schemat 48).<sup>140</sup> Związkiem wyjściowym była porfiryna **239**, którą można otrzymać przez częściową redukcję pochodnej **238** borowodorkiem sodu.<sup>141</sup> W obecności kwasu trifluorometanosulfonowego porfiryna **239** ulega dimeryzacji. Następnie, grupy karbonylowe obecne w związku **240** zostały zredukowane  $\text{NaBH}_4$  i poddane reakcji z chlorkiem benzoilu. W wyniku reakcji eliminacji odtworzony został układ wiązań podwójnych w pozycji 3 i 8. W następnym kroku grupy winylowe utleniono  $\text{OsO}_4$ , a otrzymany alkohol **242** poddano reakcji z chlorkiem kwasowym dekaboranu otrzymując pożądaną pochodną **243**. Niestety, mimo dużego nakładu pracy włożonej w syntezę tych związków, autorzy nie pokusili się dotychczas o zbadanie ich efektywności związków.

W zespole Morgana do syntezy związków przeznaczonych do BNCT wykorzystano pochodne hematoporfiryny **246** alkilowane na atomach tlenu w pozycjach 3 i 8.<sup>142</sup> Do tych pochodnych przyłączano karbaborany modyfikując grupy estrowe w pozycjach 13 i 17 (Schemat 49). Na początku przygotowano potrzebny związek borowy **245**. W reakcji dekaboranu z bromkiem propargilu otrzymano karbaboran **244**, który w reakcji z magnezem przekształcono w pożądaną boran **243**



Schemat 48. Synteza dimerycznej pochodnej hemu **243**. (i)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH, DCM, 5 °C, 20 min, 75%; (ii)  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ , DCM, 5 dni, 88%; (iii)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH; (iv) DMF, chlorek benzoilu, 95 °C, 1 godz., 80%; (v)  $\text{OsO}_4$ , pirydyna, 1,4-dioksan, 16 godz., 35%; (vi)  $\text{B}_{10}\text{H}_{10}\text{COCl}$ , DMAP, DCM, 25%.

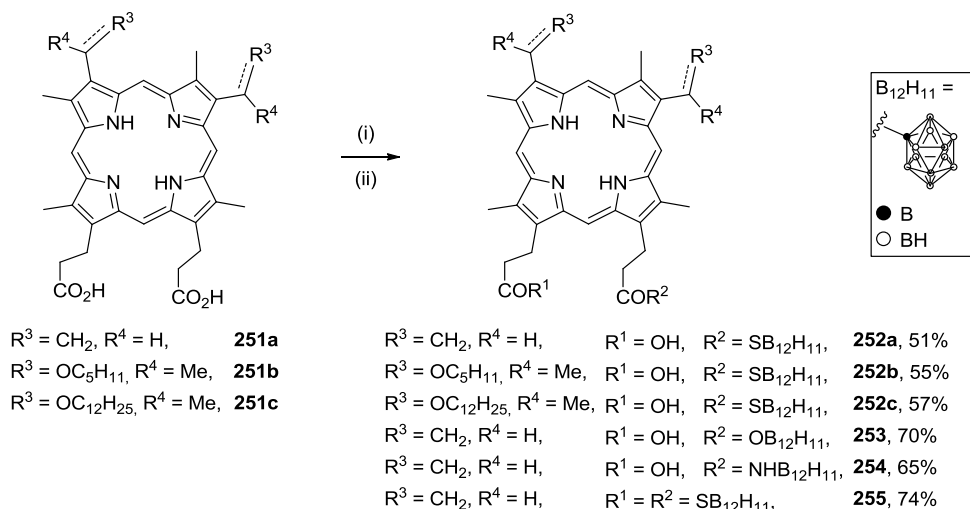




Schemat 49. Modyfikacje pochodnych PPIX prowadzone w grupie Morgana. (i) Toluen, MeCN, 18 godz., wrzenie; (ii) Mg, Et<sub>2</sub>O, potem NH<sub>4</sub>Cl; (iii) LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O, 60%; (iv) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>SO<sub>2</sub>Cl; (v) NaI, 70%; (vi) **244**, *n*-BuLi, THF, 60%.

Z kolei pochodne hematoporfiryny **246a-d** poddano redukcji glinowodorkiem litu do odpowiednich alkoholi. Po przekształceniu ich w grupy łatwo odchodzące w reakcji z chlorkiem benzosulfonowym, związki **248a-d** poddano substytucji nukleofilowej z NaI. W ostatnim etapie karbaboran **245** alkirowano w reakcji z *n*-BuLi i jodkami **2499a-d**. Otrzymano w ten sposób cztery borowe pochodne hematoporfiryny o różnej lipofilowości **250a-d**. Niestety, podobnie jak w przypadku porfiryn Kehla i Fairchilda wyniki badań biologicznych nie zostały opublikowane.

Nakamura opisał modyfikacje pochodnych hemu wykorzystując reaktywność grup karboksylowych w pozycjach 13 i 17 (Schemat 50).<sup>143</sup> W reakcji porfiryn **251a-c** z chlorkiem oksalilu otrzymano chlorki kwasowe, które poddano reakcji z boranem posiadającym wolną



Schemat 50. Modyfikacje pochodnych hemu z wykorzystaniem reakcji Schottena-Baumanna. (i) (COCl)<sub>2</sub>, DCM, 1 godz.; (ii) RB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>, gdzie R = OH, SH lub NH<sub>2</sub>, pirydyna, MeCN, 72 godz.

grupę hydroksylową, aminową lub tiolową. W przypadku pochodnej tiolowej w zależności od stechiometrii reakcji porfiryny **251a** z chlorkiem oksalilu otrzymano mono- lub diboranowe pochodne tioamidów. Nie skomentowano jednak regioselektywności reakcji, która powinna zachodzić jednocześnie na obu grupach karboksylowych.

W tym przypadku dla monoboranowych związków przeprowadzono wstępne badania biologiczne. Związki te są stabilne w cytoplazmie i nie są cytotoksyczne w ciemności. Co więcej, pochodne **252c**, **253** i **254** są dobrze wchłaniane przez komórki nowotworowe różnych typów. Właściwości te sprawiają, że związki te są dobrymi kandydatami do dalszych testów nad zastosowaniem ich w BNCT.

Metodologia BNCT jest skomplikowana, a mimo to rozwija się w bardzo szybkim tempie. Szybko rozwiązywane są kolejne problemy dzielące ją od wprowadzenia jej do powszechnej praktyki. Można jednak odnieść wrażenie, że problem wprowadzania atomów boru selektywnie do komórek nowotworowych nie jest łatwy. Wyraźnie widać tę tendencję obserwując ilość publikacji dotyczącej syntezy nowych związków w celach PDT i BNCT. Biorąc pod uwagę obiecujące wyniki dotychczasowych badań biologicznych można założyć, że w bliskiej przyszłości może dojść do przełomu i więcej grup badawczych zainteresuje się tą zaawansowaną i wciąż eksperymentalną metodą leczenia nowotworów.

## **2.5. Podsumowanie**

Naturalne związki tetrapirołowe posiadają szereg unikalnych właściwości fotofizycznych oraz biologicznych. Cechy te powodują, że znalazły one zastosowanie w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych, takich jak PDT oraz BNCT.

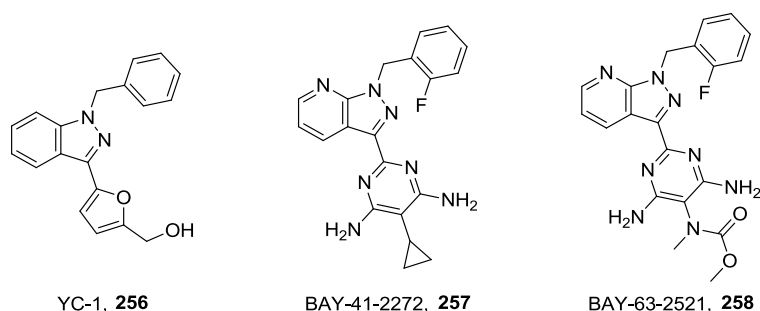
Do terapii fotodynamicznej najczęściej wykorzystuje się pochodne chlorofilu i bakteriochlorofilu, decydują o tym ich właściwości fotofizyczne (wysoki współczynnik ekstynkcji, absorpcja światła dla fal  $\lambda > 630$  nm).

W przypadku związków wykorzystywanych do terapii borowo-neutronowej istotniejsza jest łatwość wprowadzania pożądaných modyfikacji i selektywność akumulacji w komórkach nowotworowych. W tym wypadku zarówno pochodne chlorofilu jak i hemu mają równie dobrze opracowane metody modyfikacji i nie różnią się znacząco wymaganymi właściwościami biologicznymi, dlatego ich pochodne występują równie często jako przykłady związków czynnych w BNCT.

Pochodne witaminy B<sub>12</sub> cechuje bardzo silne i selektywne wiązanie anionów cyjankowych. W tym wypadku opracowane metody pozwalają bardzo szybko i precyzyjnie określić bardzo małą zawartość cyjanków w próbkach.

### 3. Badania własne

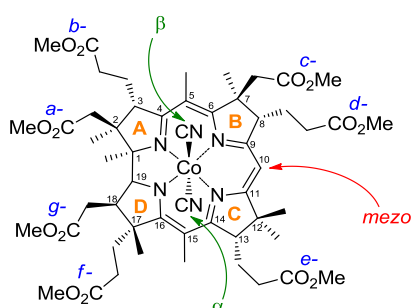
Cytozolowa cyklaza guanylowa (sGC) jest enzymem katalizującym przemianę guanozynotrójfosforanu (GTP) w cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP). Powstawanie cGMP rozpoczyna kaskadę przemian biochemicznych prowadzących, między innymi, do rozszerzenia się naczyń krwionośnych. Endogennym aktywatorem sGC jest tlenek azotu(II). Aktywowanie enzymu następuje w wyniku utworzenia wiązania koordynacyjnego N-Fe hemu i następnych zmian konformacyjnych. W stanach chorobowych, przy występującym niedotlenieniu mięśnia sercowego, w celu rozszerzenia naczyń krwionośnych podaje się leki aktywujące sGC. Ogromną większość stanowią związki z grupy nitroestrów (np. nitrogliceryna), z których w organizmie wytwarza się NO. Niestety leki te, wywołują wiele efektów ubocznych, z tego powodu poszukuje się aktywatorów sGC, działających niezależnie od NO.<sup>144</sup> Jednym z pierwszych aktywatorów tego typu był podstawiony benzopirazol YC-1 **256** (Rysunek 13). W toku optymalizacji struktury opracowano szereg pochodnych



Rysunek 13. Struktura niezależnych od NO aktywatorów sGC.

<sup>1</sup>H-pirazolo[3,4-β]pirydyny, z których BAY-41-2272 **257** oraz BAY 63-2521 **258** okazały się najefektywniejszymi aktywatorami. BAY 63-2521 (Riociguat lub Adempas) został w ubiegłym roku zatwierdzony przez FDA.

Według badań z ostatnich lat, pochodne kwasu kobyrynowego aktywują sGC

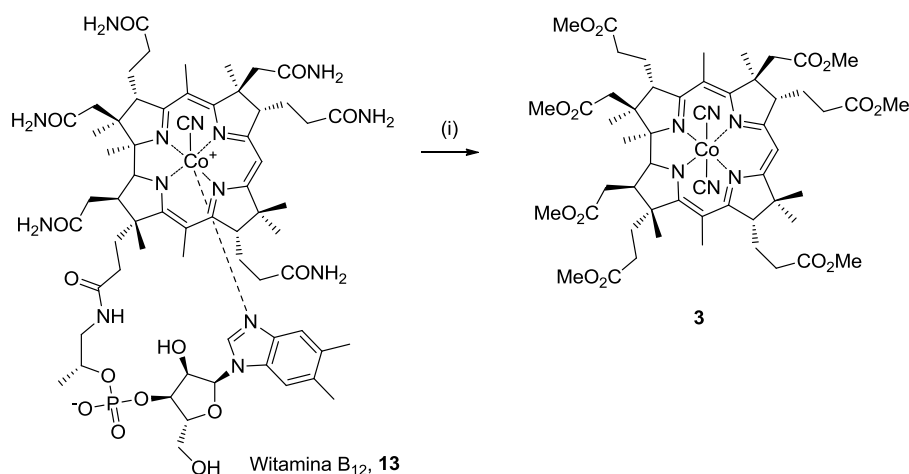


Rysunek 14. Heptaester metylowy kwasu kobyrynowego **3** z zaznaczonymi pozycjami.

niezależnie od NO, jednak mechanizm ich działania pozostaje niewyjaśniony.<sup>3,145-149</sup> Wiadomo, że pochodne te oddziałują z enzymem w innym miejscu wiążącym niż tlenek azotu. W celu poznania sposobu ich oddziaływania, celowym wydawało się przebadanie większej liczby związków kobyrynowych, zmodyfikowanych w różnych pozycjach (Rysunek 14). W momencie rozpoczynania przeze mnie badań, istniały jedynie doniesienia na temat selektywnych modyfikacji

pochodnych witaminy B<sub>12</sub> w pozycjach *c*- i *mezo*-, oraz możliwości przeprowadzania reakcji na atomie kobaltu. Jako cel mojej pracy obrałem znalezienie prostych, selektywnych metod syntezy nowych pochodnych kwasu kobyrynowego.

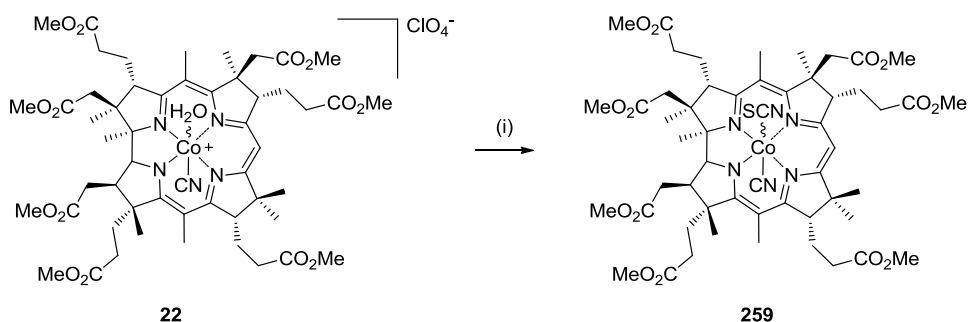
Katalizowana kwasem siarkowym metanoliza witaminy B<sub>12</sub> prowadzi do przemiany grup amidowych w estry metylowe (Schemat 51). Heptaester **3** ma właściwości hydrofobowe i rozpuszcza się w większości rozpuszczalników organicznych. Ta łatwa do otrzymania pochodna kwasu kobyrynowego była podstawowym substratem do większości wykonywanych przeze mnie syntez.



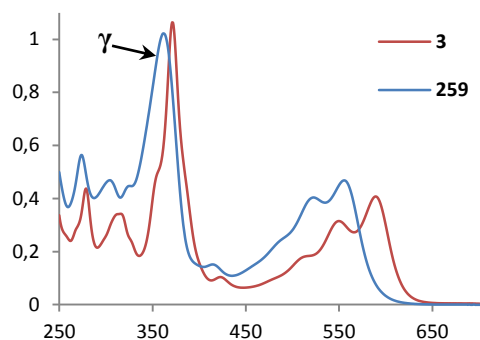
Schemat 51. Synteza estru metylowego kwasu kobyrynowego. (i) MeOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, wrzenie, 5 dni.

### 3.1. Wymiana liganda aksjalnego

Opierając się na doniesieniach literaturowych, postanowiłem otrzymać pochodne heptaestru **3** posiadające proste, inne niż cyjanek, ligandy aksjalne.<sup>150</sup> Dogodna metoda syntezy kompleksów różniących się rodzajem liganda aksjalnego, polega na otrzymaniu akwakompleksu **22**, a następnie potraktowaniu go roztworem odpowiedniej soli (Schemat 52).



Schemat 52. Synteza tiocyjanianowej pochodnej heptaestru metylowego kwasu kobyrynowego. (i) KSCN, H<sub>2</sub>O, 90%.



Rysunek 15. Nałożone widma UV/Vis heptaestru **3** oraz pochodnej **259** wykonane w DCM-ie,  $C_m = 3.5 \times 10^{-5}$  M.

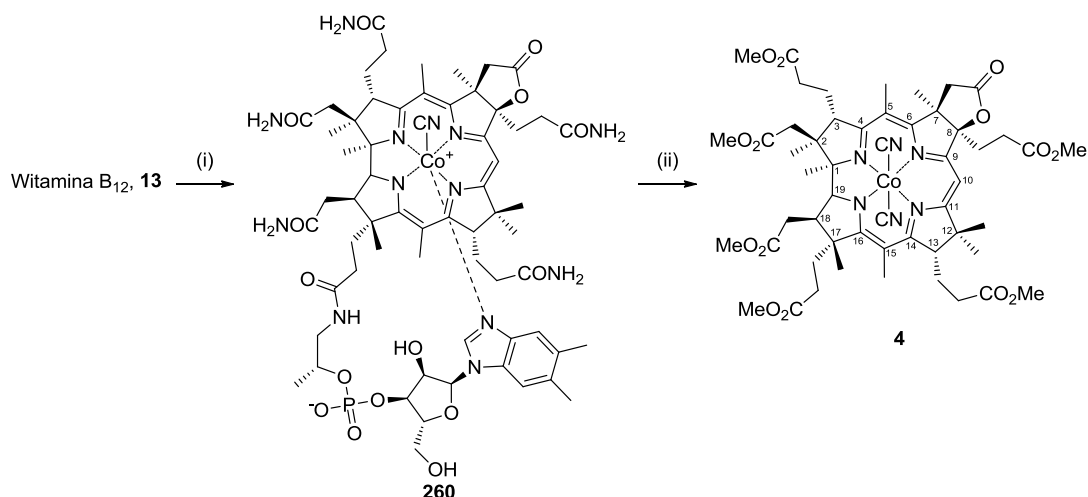
potraktowałem wodnym roztworem rodanku potasu. Reakcja wymiany liganda przebiegła bardzo szybko (TLC). W widmie spektrometrii mas (MS/ESI) otrzymanego produktu najintensywniejszy sygnał ( $m/z = 1062$ ) odpowiadał jonowi  $[M-SCN]^+$ . Niestety, analogiczny sygnał obserwuje się również w widmie MS/ESI substratu. Analiza ta, nie pozwoliła mi potwierdzić czy reakcja wymiany liganda dała pożądaną produkt. Natomiast widmo spektrometrii mas wykonane metodą jonizacji desorpcją polem (MS/FD – *ang.* Mass Spectrometry / Field Desorption) potwierdziło otrzymanie produktu, zaobserwowałem jon molekularny  $[M]^+$ . Analiza elementarna była zgodna dla wszystkich oznaczonych pierwiastków (C, H, N, S) i potwierdziła czystość otrzymanego kompleksu. Ponadto porównanie widm absorpcyjnej spektroskopii IR substratu i produktu wykazało, że w widmie tego ostatniego oprócz sygnału przypisanego drganiom charakterystycznym dla grupy cyjankowej ( $2134 \text{ cm}^{-1}$ ), pojawiło się intensywne pasmo przy liczbie falowej  $2078 \text{ cm}^{-1}$ , które przypisałem drganiom grupy tiocyjanianowej.<sup>151</sup> W widmie UV/Vis pasma zostały przesunięte hipsochromowo, w porównaniu do widma kompleksu dicyjankowego **3**, przy czym pasmo  $\gamma$  o największej intensywności było wyraźnie poszerzone (Rysunek 15). W widmie  $^1\text{H}$  NMR zaobserwowałem dwa zestawy sygnałów pochodzące od dwóch regioizomerów  $\alpha$  i  $\beta$ .

Następnie podjąłem próbę otrzymania pochodnej azydkowej związku **22**. Pomimo wydłużenia czasu reakcji akwakompleksu **22** z  $\text{NaN}_3$ , nie zaobserwowałem pełnej konwersji. Produkt reakcji ulegał rozkładowi podczas chromatografii na żelu krzemionkowym, dlatego nie udało mi się go wydzielić w postaci pozwalającej na wykonanie analiz potwierdzających otrzymanie pożądanego produktu. Mimo to, w widmie MS/FD mieszaniny otrzymanej przez odparowanie głównej frakcji otrzymanej podczas chromatografii kolumnowej obserwowałem obecność sygnału pochodzącego od jonu molekularnego  $[M]^+$ . W widmie IR obok charakterystycznego słabego pasma drgań rozciągających grupy cyjankowej ( $2128 \text{ cm}^{-1}$ ) zaobserwowałem bardzo intensywne pasmo, które przypisałem drganiom rozciągającym grupy azydkowej ( $2014 \text{ cm}^{-1}$ ).

Zdolność do aktywacji sGC przez kompleks tiocyjanianowy **259** została zbadana przez zespół Emila Martina. Okazało się, że aktywuje on sGC gorzej od heptaestru **3**, wykazując dodatkowo wraz ze zwiększeniem stężenia efekt inhibujący enzym.

### 3.2. Otwieranie *c*-laktonu aminami

Selektywne modyfikacje pochodnych kwasu kobyrinowego przeprowadza się najczęściej różnicując terminalne grupy estrowe poprzez utworzenie *c*-laktonu, a następnie przekształcenie go w *c*-zmodyfikowane pochodne. *c*-Lakton otrzymuje się traktując roztwór cyjanokobalaminy w kwasie octowym *N*-bromosukcynimidem (NBS) (Schemat 53). Na początku bromowaniu ulega węgiel w pozycji C8, a następnie w warunkach reakcji zamyka się pięciocłonowy pierścień *c*-laktonu.<sup>152</sup>



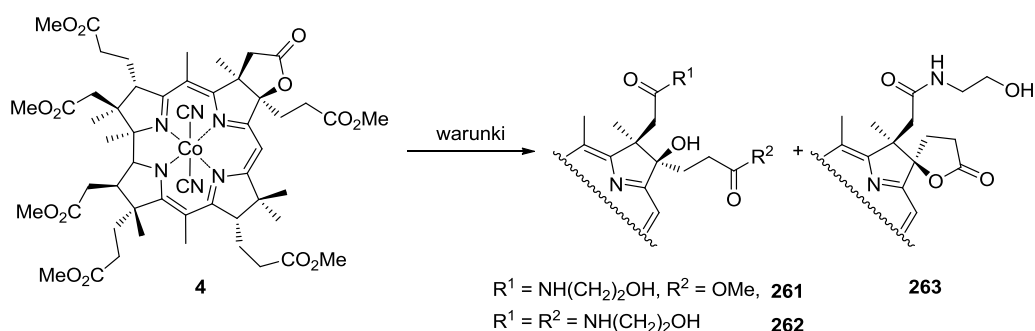
Schemat 53. Otrzymywanie *c*-laktonu (i) NBS, AcOH, 60 min; (ii) MeOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 65 °C, 5 dni.

Wilbur i współpracownicy opracowali metodę otwierania *c*-laktonu **260** w stopionym 1,12-diaminododekanie.<sup>153</sup> Podobne podejście zastosował Alberto w 2004 roku, w analogicznej reakcji *c*-laktonu **260** z 1,4-diaminobutanem jako nukleofilem.<sup>154</sup> W momencie rozpoczęcia przeze mnie badań, w literaturze nie było doniesień na temat otwierania *c*-laktonu **4**. Pochodną tą otrzymałem z witaminy B<sub>12</sub>, zgodnie z procedurą literaturową opisaną przez Darbre i Keese.<sup>155</sup>

#### 3.2.1. Identyfikacja produktów reakcji *c*-laktonu z etanoloaminą

Do opracowania metody otwierania pierścienia *c*-laktonu wybrałem reakcję z etanoloaminą (Schemat 54). Wybór aminy podyktowany był spodziewaną istotną różnicą w polarności produktu i substratu, co w konsekwencji znacznie ułatwiłoby mi monitorowanie reakcji oraz wydzielanie produktu. W reakcji etanoloaminy z *c*-laktonem w DCM zauważyłem tworzenie się dwóch głównych produktów oraz trzeciego w ilościach śladowych,

o polarności zbliżonej do substratu. Związki te wydzieliłem i zanalizowałem ich struktury na podstawie widm spektrometrii mas i magnetycznego rezonansu jądrowego. Okazały się nimi *c*-monoamid **261**, *c,d*-diamid **262** oraz *d*-spirolakton **263** (Schemat 54).



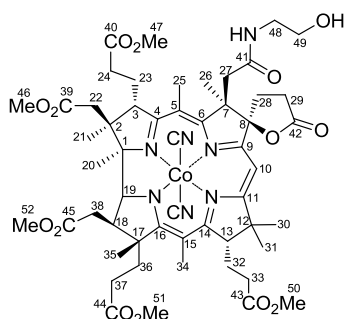
Schemat 54. Reakcja modelowa otwierania *c*-laktonu.

Najmniej polarnym produktem był *c*-monoamid **261**. W widmie spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości sygnał  $m/z = 1107.469$  odpowiadał wartości obliczonej dla jonu pseudomolekularnego  $[\text{M}-\text{CN}]^+$  pożądanego produktu **261**. Jony tego typu są bardzo charakterystyczne dla pochodnych kwasu kobrynowego i najczęściej, w widmach spektrometrii mas otrzymanych metodą ESI sygnał ten ma największą intensywność.

W widmie  $^1\text{H}$  NMR tryplet ( $J = 4.5$  Hz) przy 6.97 ppm przypisałem protonowi amidowemu (CONH). W zakresie 3.74-3.61 ppm zidentyfikowałem cztery singlety, o intensywności integralnej odpowiadającej sześciu grupom estrowym ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ). Sygnały pochodzące od protonów  $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  nie były możliwe do przypisania, ze względu na nakładanie się ich z sygnałami odpowiadającymi innym grupom protonów. Analiza elementarna potwierdziła czystość otrzymanego produktu **261**.

Drugim związkiem o znacznie większej polarności, który powstał w reakcji *c*-laktonu z etanoloaminą był *c,d*-diamid **262**. W widmach  $^1\text{H}$  NMR diagnostyczne okazały się sygnały – poszerzony tryplet przy 7.00 ppm ( $J = 3.2$  Hz) oraz szeroki singlet przy 6.95 ppm, które odpowiadały dwóm protonom grup amidowych (CONH).

W zakresie występowania sygnałów pochodzących od protonów grup metoksylowych (3.8-3.5 ppm), obecne były cztery singlety o intensywności integralnej, odpowiadającej pięciu grupom  $\text{CO}_2\text{CH}_3$  (dwa singlety nakładały się). Podobnie jak w przypadku monoamidu **261**, nie udało się dokładnie przypisać sygnałów pochodzących od protonów  $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ .



Rysunek 16. Numeracja *d*-spirolaktonu **263**.

Trzecim wyizolowanym związkiem, tworzącym się w śladowych ilościach, był *d*-spiroolakton **263** (Rysunek 16). W widmie MS/ESI sygnał o  $m/z = 1101.4$  przypisałem jonowi molekularnemu  $[M]^+$ . Sygnał ten nie był najintensywniejszy, towarzyszyły mu sygnały o większej intensywności, które przypisałem jonom pseudomolekularnym  $[M-CN]^+$  oraz  $[M+Na]^+$ , odpowiednio  $m/z = 1075.4$ , oraz  $1124.4$ . Widmo MS/ESI wysokiej rozdzielczości zostało wykonane dla jonu molekularnego  $[M]^+$ , znaleziony stosunek  $m/z = 1101.4412$  bardzo dobrze korelował z wartością obliczoną ( $m/z = 1101.4463$ ).

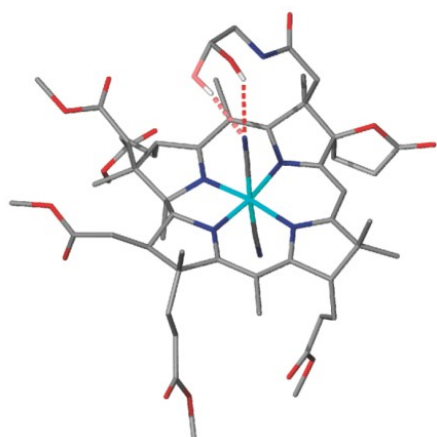
W widmie  $^1H$  NMR szeroki tryplet, o przesunięciu chemicznym 6.99 ppm i stałej sprzężenia  $J = 3.0$  Hz, przypisałem protonowi grupy amidowej. W zakresie występowania sygnałów pochodzących od protonów grup metoksyowych obecnych jest pięć singletów w zakresie 3.77-3.60 ppm, które odpowiadają protonom pięciu grup estrowych  $CO_2CH_3$ . Zamknięcie pierścienia laktonu w pozycji *d*- potwierdziłem na podstawie odnalezionych korelacji w dwuwymiarowych widmach NMR: COSY, HSQC oraz HMBC. Najbardziej charakterystycznym sygnałem w widmie  $^1H$  NMR jest sygnał protonu *mezo*-, ponieważ jest on mocno przesunięty w dół pola i dzięki temu jest odizolowany od innych sygnałów. W widmie HSQC sygnał ten (singlet 5.58 ppm) korelował z sygnałem węgla przy 86.4 ppm (C10), natomiast w widmie HMBC sprzęgał się z czterema sygnałami węglowymi – C8 (93.7 ppm), C12 (47.6 ppm), C9 (168.7 ppm) oraz C11 (178.6 ppm). W ten sposób przypisałem

Tabela 1. Przypisanie sygnałów w widmie  $^1H$  NMR na podstawie analizy widm dwuwymiarowych *d*-spiroolaktonu **263**.

Przesunięcie chemiczne	Rodzaj sygnału	Przypisanie	Przesunięcie chemiczne	Rodzaj sygnału	Przypisanie
6.99	bt	NH	2.44-2.38	m	$CH_2CO_2CH_3$ $\alpha$ - $CH_2$ lakton
5.57	s	<i>mezo</i> -CH	2.30	d	$CH_2CO_2CH_3$
3.77-3.73	m	CH	2.26	s	$CH_3$
3.73	s	$CO_2CH_3$	2.21-2.15	m	$CH_2CH_2CO_2CH_3$ $\beta$ - $CH_2$ lakton
3.70	s	$CO_2CH_3$	2.12-2.00	m	$CH_2CH_2CO_2CH_3$
3.68	s	$CO_2CH_3$	2.11	s	$CH_3$
3.67	s	$CO_2CH_3$	1.86-1.80	m	$CH_2CH_2CO_2CH_3$
3.60	s	$CO_2CH_3$	1.78	s	$CH_3$
3.47-3.42	m	$CH_2OH$	1.49	s	$CH_3$
3.19-3.17	m	$CH_2CH_2OH$	1.38	s	$CH_3$
2.83-2.79	m	$CH_2CH_2CO_2CH_3$	1.37	s	$CH_3$
2.73-2.63	m	$CH_2CO_2CH_3$ $CH_2CH_2CO_2CH_3$ $CH_2CONH$	1.27	s	$CH_3$
2.52-2.47	m	$CH_2CO_2CH_3$ $CH_2CH_2CO_2CH_3$	1.20	s	$CH_3$

s – singlet; bt – szeroki tryplet; m – multiplet; d – dublet.



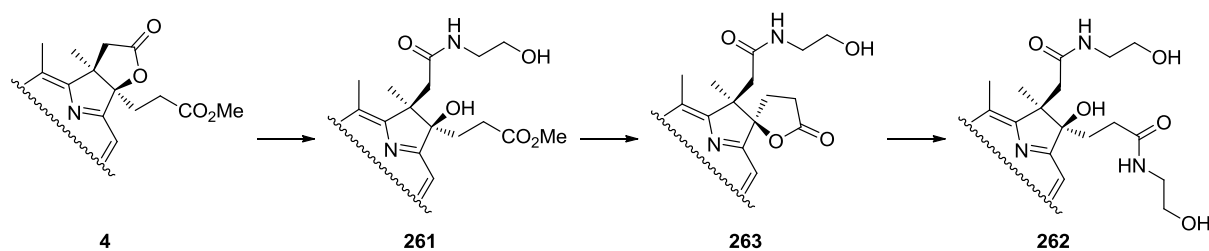


Rysunek 17. Struktura X-ray *d*-spirolaktonu **263**.

korelację sygnału przy 2.21-2.15 ppm z sygnałem przy 2.44-2.38 ppm. Przypisanie sygnałów obserwowanych w widmie  $^1\text{H}$  NMR do odpowiadających im atomom zestawilem w tabeli (Tabela 1).

Ostatecznie, strukturę *d*-spirolaktonu **263** potwierdzono metodą rentgenowskiej analizy strukturalnej (Rysunek 17). Monokryształ, odpowiedni do jej wykonania, otrzymałem metodą dyfuzji par eteru dietylowego do roztworu *d*-spirolaktonu **263** w etanolu. Odległości pomiędzy atomami azotu w pierścieniach A oraz D, a atomem kobaltu, są nieco krótsze od analogicznych odległości pomiędzy atomami azotu z pierścieni B oraz C, a atomem kobaltu (kolejno długości wiązań N–Co w pierścieniach A-D: 1.867(4) Å, 1.905(4) Å, 1.919(4) Å, 1.870(4) Å). Pierścień koryny nie jest płaski, kąt pomiędzy płaszczyzną utworzoną przez pierścienie pirolowe A oraz B, względem płaszczyzny utworzonej przez pierścienie pirolowe C oraz D wynosi 10.8°. Rentgenowska analiza strukturalna potwierdziła retencję konfiguracji na atomie węgla C8. Terminalna grupa hydroksylowa amidu w pozycji *c*- tworzyła wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe z  $\beta$  aksjalnym ligandem cyjankowym.

Tworzenie się *d*-spirolaktonu **262** jako związku pośredniego wyjaśniło przebieg i regioselektywność reakcji *c*-laktonu z etanoloaminą, prowadzącą do powstania *c,d*-diamidu **262** (Schemat 55). W pierwszym etapie zachodzi nukleofilowy atak etanoloaminy na pierścień *c*-laktonu **4**, w wyniku którego powstaje monoamid **261**. Następnie w warunkach reakcji tworzy się pierścień *d*-spirolaktonu **263**, który reagując z drugą cząsteczką etanoloaminy daje *c,d*-diamid **262**.

Schemat 55. Przebieg reakcji *c*-laktonu **4** z etanoloaminą.

### 3.2.2. Dobór rozpuszczalnika reakcji

Wynik przeprowadzonej reakcji był bardzo obiecujący, ponieważ poza otrzymaniem *c*-monoamidu **261**, w reakcji tworzyły się nieznanymi dotąd *c,d*-diamid **262** i *d*-spirolakton **263**. Ten ostatni potencjalnie mógł posłużyć do otrzymywania pochodnych selektywnie modyfikowanych w pozycji *d*-. W momencie rozpoczęcia przeze mnie badań, nie istniała metoda selektywnej modyfikacji pozycji *d*-, dlatego też postanowiłem zbadać przebieg reakcji i zoptymalizować warunki selektywnego otrzymywania kolejno: *c*-monoamidu **261**, *c,d*-diamidu **262** i *d*-spirolaktonu **263**.

Optymalizację rozpocząłem od zbadania wpływu rozpuszczalnika na omawianą reakcję (Tabela 2). Najwyższą wydajność syntezy *c*-monoamidu **261** otrzymałem stosując jako rozpuszczalnik 1,4-dioksan (Tabela 2, wiersz 1).

Tabela 2. Wpływ rozpuszczalnika na wydajność reakcji laktonu **4** z etanoloaminą.

L.p.	Rozpuszczalnik	Monoamid <b>261</b> [%]	Diamid <b>262</b> [%]	<i>d</i> -Spirolakton <b>263</b> [%]
1	1,4-Dioksan	72	–	–
2	AcOEt	62	8	–
3	CHCl <sub>3</sub>	58	–	Ślady
4	MeCN	57	–	–
5	DCM	56	18	3
6	THF	55	–	–
7	Aceton	48	7	–
8	<i>i</i> -PrOH	47	13	Ślady
9	EtOH	19	34	–
10	Toluen <sup>(a)</sup>	2	4	–
11	CCl <sub>4</sub> <sup>(a)</sup>	Ślady	Ślady	Ślady

Warunki reakcji: *c*-lakton **4** 14 μmol, etanoloamina 10 ekwiwalentów, rozpuszczalnik 1 mL, temperatura pokojowa, 5 godzin. (a) Zaobserwowałem tworzenie się polarnych produktów ubocznych reakcji (analiza TLC).

Reakcja w tym rozpuszczalniku była również najbardziej selektywna, w mieszaninie reakcyjnej poza produktem **261** obserwowałem jedynie nieprzereagowany substrat **4**. Z tych powodów, wybrałem 1,4-dioksan do dalszej optymalizacji syntezy *c*-monoamidu **261**. Wśród testowanych rozpuszczalników największą wydajność otrzymywania *c,d*-diamidu **262** zaobserwowałem w reakcji prowadzonej w etanolu (wiersz 9), jednak reakcja ta nie była

selektywna. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku reakcji w 2-propanolu (wiersz 8). Z powodu niskiej selektywności rozpuszczalniki te nie były brane pod uwagę w dalszych badaniach. W reakcji prowadzonej w DCM *c,d*-diamid **262** otrzymałem z wydajnością 18% (wiersz 5) i prowadziła ona wyłącznie do mieszaniny pożądaných produktów **261-263**, dlatego też do dalszych badań jako rozpuszczalnik wybrałem DCM. Okazał się on również dobrym rozpuszczalnikiem do syntezy *d*-spiroolaktonu **263**. Tworzenie się tego związku obserwowałem w rozpuszczalnikach chlorowcopochodnych oraz w 2-propanolu (wiersze 3, 5, 8, 11). W przypadku najmniej polarnych rozpuszczalników konwersja reakcji była praktycznie całkowita, niska wydajność wynikała z powstawania licznych polarnych produktów ubocznych.

### 3.2.3. Optymalizacja reakcji otrzymywania *c*-monoamidu **261**

W reakcji *c*-laktonu **4** z etanoloaminą istotnym parametrem reakcji był czas. W reakcjach prowadzonych zbyt krótko, nie obserwowałem pełnej konwersji substratu **4**, natomiast w reakcjach prowadzonych zbyt długo, następowało zamykanie pierścienia spiroolaktonu **263**, który reagował dalej z etanoloaminą dając *c,d*-diamid **262** (Tabela 3, wiersze 1 i 2). Po 5 godzinach pożądaný związek **263** otrzymałem z wydajnością 72%. Przedłużenie czasu reakcji powodowało powstawanie *c,d*-diamidu **262**. Następnie, postanowiłem przeprowadzić reakcję *c*-laktonu **4** ze zmniejszoną ilością etanoloaminy, co stwarzało konieczność wydłużenia czasu reakcji (wiersze 3 i 4). Zarówno w reakcjach prowadzonych w DCM jak i 1,4-dioksanie nie obserwowałem powstawania *c,d*-diamidu **262**. Ostatecznie za optymalne warunki otrzymywania *c*-monoamidu **261** przyjąłem: stężenie *c*-laktonu **4** 0.014 M, 10 ekwiwalentów aminy, rozpuszczalnik – 1,4-dioksan, temperaturę pokojową, czas reakcji 5 godzin (wiersz 1).

Tabela 3. Optymalizacja otrzymywania monoamidu.

Lp.	Ilość aminy [ekwiw.]	Rozpuszczalnik	Czas [godz.]	Monoamid <b>261</b> [%]	Diamid <b>262</b> [%]
1	10	1,4-Dioksan	5	72	–
2	10	1,4-Dioksan	16	68	20
3	4	1,4-Dioksan	29	72	–
4(a)	4	DCM	29	61	–
5(b)	4	1,4-Dioksan	16	38	37
6(b)	4	DCM	6	57	–

Warunki reakcji: *c*-lakton **4** 14 μmol, rozpuszczalnik 1 mL. (a) Wydajność *d*-spiroolaktonu – 11%. (b) Temperatura 50 °C, reakcję prowadzono w próbkówce ciśnieniowej.

W reakcjach *c*-laktonu z etanoloaminą prowadzonych w DCM stwierdziłem, że gdy użyto mniejszej ilości aminy (4 ekwiwalenty) tworzyła się duża ilość *d*-spiroolaktonu **263** (11%)

(Tabela 3, wiersz 4), a gdy aminy użyto więcej (10 ekwiwalentów) obserwowalem tworzenie się *c,d*-diamidu **262** (Tabela 2, wiersz 5). Informacje te posłużyły mi do dalszej optymalizacji syntezy *d*-spiroolaktonu **263**.

### 3.2.4. Optymalizacja reakcji otrzymywania *c,d*-diamidu **262**

Optymalizując warunki reakcji otrzymywania pochodnej diamidowej **262**, skupilem się na reakcjach prowadzonych w DCM w temperaturze pokojowej, ponieważ podwyższanie temperatury prowadziło do skomplikowanych mieszanin reakcyjnych. (Tabela 3, wiersze 5 i 6). Na początku zwiększyłem nadmiar aminy do 120 ekwiwalentów (Tabela 4, wiersze 1-4). Po 16 godzinach w mieszaninie reakcyjnej zaobserwowałem jedynie ślady amidu **261**, natomiast pożądaną diamid **262** tworzył się z wydajnością 57%, powstawało również dużo innych produktów. Okazało się, że skrócenie czasu reakcji do 6 godzin pozwoliło otrzymać produkt **262** z wydajnością 75% (wiersz 2). Zbyt duży nadmiar aminy powodował tworzenie się produktów następczych reakcji aminolizy grup estrowych (wiersze 5 i 6). Ostatecznie najwyższą wydajność *c,d*-diamidu **262** otrzymałem w następujących warunkach: stężenie *c*-laktonu **4** 0.014 M, 120 ekwiwalentów aminy, rozpuszczalnik DCM, temperatura pokojowa, czas reakcji 6 godzin (wiersz 2).

Tabela 4. Optymalizacja otrzymywania diamidu **262**.

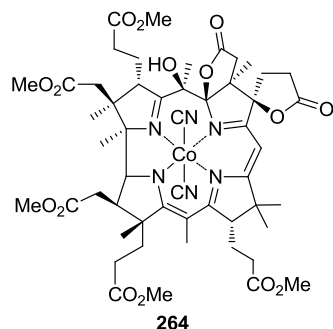
Lp.	Etanoloamina [ekwiw.]	Czas	Monoamid <b>261</b> [%]	Diamid <b>262</b> [%]
1	120	3 godz.	10	43
2	120	6 godz.	19	75
3	120	16 godz.	Ślady	57
4(a)	120	40 min.	48	32
5	1200	3 godz.	–	37
6(a)	1200	40 min	–	29

Warunki reakcji: *c*-lakton **4** 14 μmol, DCM 1 mL, temperatura pokojowa. (a) Jako substrat został użyty akwakompleks *c*-laktonu.

Doniesienia literaturowe sugerują, że akwakompleksy są bardziej reaktywne niż kompleksy dicyjankowe pochodnych kwasu kobyrynowego.<sup>156</sup> W moim przypadku reakcje akwakompleksu *c*-laktonu z etanoloaminą w różnych warunkach biegły szybciej (40 minut), lecz tworzyło się w nich dużo produktów ubocznych (wiersze 4 i 6).

### 3.2.5. Optymalizacja reakcji otrzymywania *d*-spiroolaktonu **263**

W 1985 roku Gossauer opisał związek **264** analogiczny do *d*-spiroolaktonu **263** i sugerował, że tworzy się on na drodze cyklizacji katalizowanej cyjankami (Rysunek 18).<sup>4</sup> Wiadomo również, że cyjanki są efektywnymi katalizatorami reakcji aminolizy.<sup>157-160</sup> Bazując na tych informacjach, jak i wynikach dotychczas przeprowadzonych eksperymentów, w celu



Rysunek 18. Spirolakton opisany przez Gossauera.

optymalizacji syntezy *d*-spirolaktonu **263**, postanowiłem sprawdzić wpływ cyjanku potasu na przebieg reakcji *c*-laktonu **4** z etanoloaminą (Tabela 5, wiersze 1, 3 i 5). W reakcji tej w obecności katalitycznej ilości KCN zaobserwowałem tworzenie się śladowych ilości *d*-spirolaktonu **263** (wiersz 1). Dopiero zastosowanie 15 ekwiwaleatów cyjanku potasu spowodowało wzrost wydajności produktu **263** do 45% (wiersz 5).

Spirolakton **263** jest produktem reakcji *c*-laktonu **4** z etanoloaminą, dlatego też w toku dalszych badań, wyizolowany *c*-monoamid **261** poddałem działaniu KCN w 1,4-dioksanie (wiersze 2, 4 i 6). Wzrost ilości cyjanku użytego do reakcji powodował wzrost wydajności *d*-spirolaktonu **263**, ostatecznie zastosowanie KCN w ilości 15 ekwiwaleatów pozwoliło otrzymać pożądany produkt **263** z wydajnością 83% (wiersz 6).

Tabela 5. Wpływ cyjanku potasu na wydajność tworzenia *d*-spirolaktonu **263**.

Lp.	Substrat	KCN [ekwiw.]	<i>d</i> -Spirolakton <b>263</b> [%]
1	<b>4</b>	0.07	Ślady
2(a)	<b>261</b>	0.07	–
3	<b>4</b>	1	29
4(a)	<b>261</b>	1	37
5	<b>4</b>	15	45
6(a)	<b>261</b>	15	83

Warunki reakcji: substrat 14  $\mu$ mol, etanoloamina 4 ekwiw., 1,4-dioksan 1 mL, temperatura pokojowa, 48 godzin. (a) Brak etanoloaminy w reakcji.

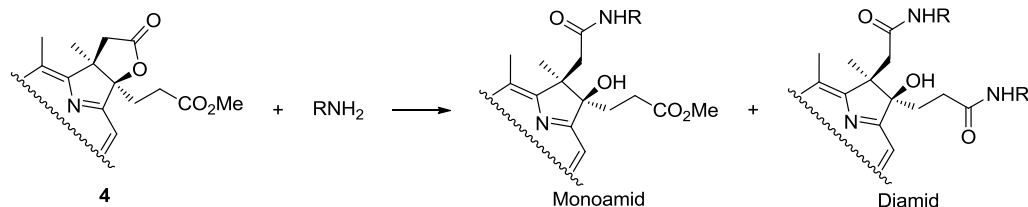
Przeprowadzone badania wykazały, że lepszym rozwiązaniem jest prowadzenie syntezy *d*-spirolaktonu **263** dwuetapowo. Sumaryczna wydajność dwóch, oddzielnych reakcji (syntezy *c*-monoamidu **261** z *c*-laktonu **4**, a następnie transformacji *c*-monoamidu **261** w *d*-spirolakton **263**) była wyższa (60%) niż wydajność syntezy *d*-spirolaktonu **263** bezpośrednio z *c*-laktonu **4** (45%).

### 3.2.6. Zakres i ograniczenia reakcji otwierania *c*-laktonu **4** aminami

W kolejnym etapie badań przystąpiłem do określenia zakresu stosowalności i ograniczeń opracowanej metody otwierania *c*-laktonu **4** aminami (Tabela 6). W przypadku każdej z amin czas reakcji musiał być odpowiednio dobrany w celu osiągnięcia pełnej konwersji (TLC). Proste, pierwszorzędowe aminy reagowały zazwyczaj szybko dając pożądane produkty z zadowalającymi wydajnościami (wiersze 1-4). Reakcje ze sterycznie zatłoczonymi aminami biegły słabo lub nie zachodziły wcale (wiersze 5 i 6). W reakcji

*c*-laktonu **4** z propargiloaminą (10 ekwiw.), pomimo wydłużonego czasu reakcji, pożądany produkt **277** otrzymałem z wydajnością 10% (wiersz 8). Dopiero zastosowanie znacznie większego nadmiaru aminy, prowadziło do podwyższenia wydajności do 69%.

Tabela 6. Zakres i ograniczenia stosowania reakcji otwierania *c*-laktonu aminami.



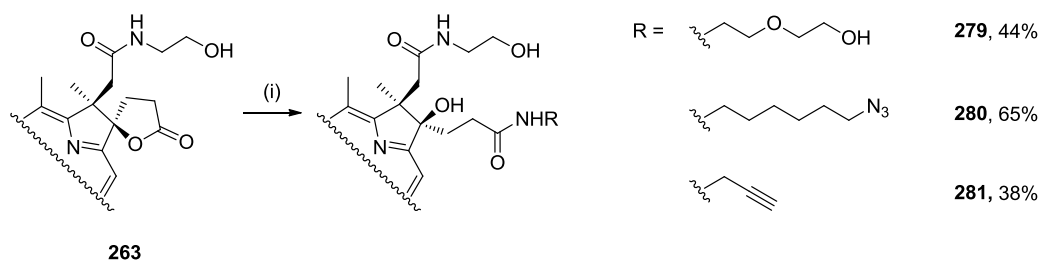
Lp.	$\text{RNH}_2$	Monoamid [wydajność, %] <sup>(a)</sup>	Diamid [wydajność, %] <sup>(b)</sup>
1	Etanoloamina	<b>261</b> [72]	<b>262</b> [75]
2	Diglikoloamina	<b>265</b> [71]	<b>266</b> [70]
3	<i>n</i> -Butyloamina	<b>267</b> [65]	<b>268</b> [53]
4	<i>n</i> -Oktyloamina	<b>269</b> [67]	<b>270</b> [40]
5	<i>i</i> -Propyloamina	<b>271</b> [25]	<b>272</b> [58]
6	<i>t</i> -Butyloamina	<b>273</b> [0]	<b>274</b> [0]
7	Benzyloamina	<b>275</b> [0]	<b>276</b> [0]
8	Propargiloamina	<b>277</b> [10]	<b>278</b> [0]
9 <sup>(c)</sup>	Propargiloamina	<b>277</b> [69]	<b>278</b> [0]

(a) Warunki reakcji: *c*-laktone **4** (14  $\mu\text{mol}$ ), amina (10 ekwiwalentów), 1,4-dioksan (1 mL), temperatura pokojowa. (b) Warunki reakcji: *c*-laktone **4** (14  $\mu\text{mol}$ ), amina (0.1 mL), DCM (1 mL), temperatura pokojowa. (c) Warunki reakcji: *c*-laktone (14  $\mu\text{mol}$ ), amina (0.1 mL), 1,4-dioksan (1 mL), temperatura pokojowa.

Struktury wszystkich nowo otrzymanych pochodnych **265-272** i **277** zostały ustalone na podstawie widm spektrometrii mas (HRMS/ESI) oraz NMR ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ ). Analizy NMR niektórych amidów były trudne do interpretacji, w widmach  $^1\text{H}$  NMR obserwowałem pojawienie się drugiego zestawu sygnałów. Zjawisko to było wcześniej obserwowane przez Alberto, ale przyczyna nie została ostatecznie podana.<sup>154</sup> W przypadku moich badań zjawisko pojawienia się drugiego zestawu sygnałów dotyczyło pochodnych posiadających alifatyczne podstawniki w pozycji *c*-, zwłaszcza gdy pomiar NMR wykonywany był w  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ . Efekt ten znacząco zmniejszał się, gdy dla tej samej substancji pomiar wykonano w deuterowanym toluenie. Drugi zestaw sygnałów prawdopodobnie wynika z labilnego charakteru liganda  $\text{CN}^-$ . W przypadku pochodnych posiadających w pozycji *c*- terminalną grupę hydroksylową nie obserwowałem tego zjawiska. Wyjaśnienie tego faktu sugeruje struktura krystalograficzna *d*-spiroolaktone **263** (Rysunek 17), w której wyraźnie widać oddziaływanie pomiędzy terminalną grupą hydroksylową a ligandem  $\text{CN}^-$ . Możliwe, że obecność terminalnej grupy hydroksylowej w pozycji *c*- stabilizuje strukturę również w roztworze.

### 3.2.7. Selektywna modyfikacja pochodnych kwasu kobyrynowego w pozycjach *c*- i *d*-

Kontynuując badania postanowiłem skupić się na selektywnej modyfikacji podstawnika w pozycji *d*- (Schemat 56). Przeprowadziłem reakcje *d*-spiroolaktonu **263** z trzema aminami posiadającymi terminalne grupy funkcyjne. Otrzymane pochodne w łatwy sposób można dalej funkcjonalizować, na przykład w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydku do alkinu. Założyłem, że warunki zoptymalizowane dla reakcji otwierania *c*-laktonu **4**, prowadzące do monoamidu, będą odpowiednie również dla reakcji otwierania *d*-spiroolaktonu **263**. W reakcji *d*-spiroolaktonu **263** z aminą (10 ekwiw.) w 1,4-dioksanie, otrzymałem związki **279-281** będące pierwszymi pochodnymi kwasu kobyrynowego, selektywnie zmodyfikowanymi w pozycjach *c*- oraz *d*-.

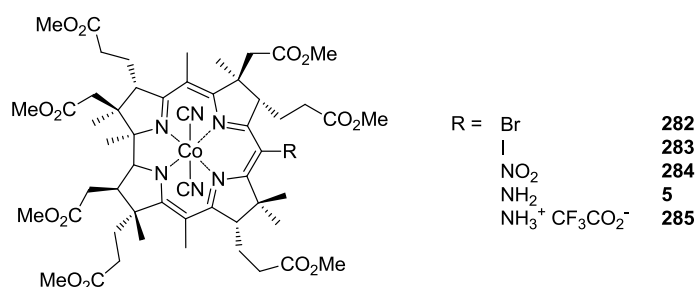


Schemat 56. Otwieranie *d*-spiroolaktonu **263**. (i) amina, 1,4-dioksan, 16-24 godz.

Otrzymane związki zostały poddane badaniom biologicznym w zespole Emila Martina z The University of Texas Health Science Center w Houston. Wyniki tych badań zostaną przedstawione w rozdziale 3.8.

### 3.3. *mezo*-Amidy

W toku dalszych badań skupiłem się na pochodnych kwasu kobyrynowego, posiadających podstawniki w pozycji *mezo*-. Proton w pozycji *mezo*- wykazuje charakter częściowo aromatyczny. Duża gęstość elektronowa w tej pozycji sprawia, że możliwe jest prowadzenie reakcji substytucji elektrofilowej i wprowadzenie w ten sposób np. grupy nitrowej (**284**). Modyfikacje w pozycji *mezo*- opisał w 1977 roku Gossauer (Rysunek 19).<sup>150</sup> Badacze niemieccy, w reakcji nitrowania heptaestru **3** zastosowali tetrafluoroboran nitrozyłu



Rysunek 19. Modyfikacje w pozycji *mezo*- opisane przez Gossauera.

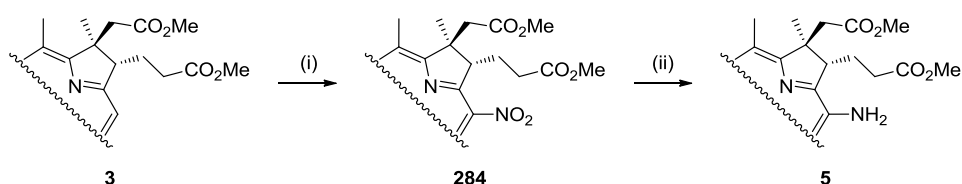
(NO<sub>2</sub>BF<sub>4</sub>). Reakcja ta przebiegała z wysoką wydajnością, jednak wymagała ściśle bezwodnych warunków oraz długiego czasu reakcji (48 godz.).

Tabela 7. Optymalizacja otrzymywania nitrozwiązku **284**.

Lp.	Reagent/[ekwiw.] <sup>(a)</sup>	Rozpuszczalnik	Stężenie <sup>(b)</sup> [mmol·mL <sup>-1</sup> ]	Czas [godz.]	Produkt <b>284</b> [%]
1	NO <sub>2</sub> BF <sub>4</sub> /1.1	AcOH	0.04	48	86 <sup>150</sup>
2	NO <sub>2</sub> BF <sub>4</sub> /8	DCM	0.02	3	80
3	NO <sub>2</sub> BF <sub>4</sub> /10	DCM	0.03	0.1	60
4	HNO <sub>3</sub> /1000	MeCN	4.1	0.5	74
5	HNO <sub>3</sub> /750	MeCN	2.4	4.5	78

(a) Stosunek molowy reagenta nitrującego do heptaestru **3**. (b) Stężenie czynnika nitrującego w mieszaninie reakcyjnej.

Sprawdziłem czy reakcję nitrowania można przeprowadzić w łagodniejszych warunkach. W analogicznej reakcji, lecz przeprowadzonej w DCM zamiast AcOH, otrzymałem nitrozwiązek **284** ze zbliżoną wydajnością, ale w znacznie krótszym czasie (Tabela 7, wiersz 1 i 2). Następnie sprawdziłem czy reakcję można przeprowadzić przy użyciu 65% kwasu azotowego(V) w acetonitrylu. Zaletą tej metody było użycie tanich odczynników, jak również brak konieczności utrzymania bezwodnego reżimu. Okazało się, że heptaester **3** ulega nitrowaniu kwasem azotowym w acetonitrylu ze zbliżoną wydajnością (wiersz 4 i 5) do podanej w oryginalnej procedurze. Za optymalne warunki syntezy nitrozwiązku **284** przyjąłem: stężenie heptaestru **3** – 3.1 mM, stężenie kwasu azotowego – 2.4 M, rozpuszczalnik – acetonitryl, temperatura pokojowa 4.5 godziny (wiersz 5). Otrzymany nitrozwiązek **284** poddałem redukcji borowodorkiem sodu w metanolu, zgodnie z procedurą opisaną przez Inhoffena (Schemat 57).<sup>150</sup> Amina **5** posłużyła mi jako materiał wyjściowy do syntezy związków posiadających w pozycji *mezo*- grupę amidową. Celem tej części pracy było otrzymanie związków i przebadanie wpływu terminalnej grupy funkcyjnej na zdolność oddziaływania tych związków z sGC.

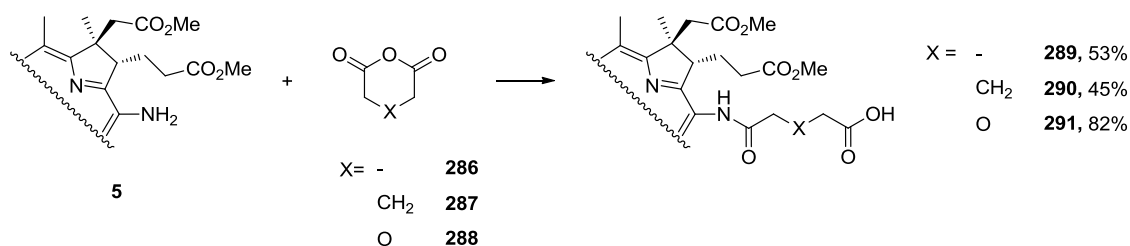


Schemat 57. Otrzymywanie *mezo*-aminy **5**. (i) HNO<sub>3</sub>, MeCN, 4.5 godz., 78%; (ii) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0 °C, 2 min., 53%.

### 3.3.1. Reakcje aminy **5** z cyklicznymi bezwodnikami

W 1998 roku Hisaeda opisał reakcję *mezo*-aminy **5** z bezwodnikiem octowym.<sup>161</sup> Zainspirowany tą pracą zaplanowałem syntezę trzech pochodnych kwasu kobyrynowego posiadających terminalne grupy karboksylowe. Aby osiągnąć zamierzony cel, przeprowadziłem reakcję aminy **5** z cyklicznymi bezwodnikami kwasów dikarboksylowych. Otrzymane pochodne różniły się jedynie fragmentem struktury, stanowiącym łącznik między koryną i grupą karboksylową (Schemat 58).



Schemat 58. Otwieranie cyklicznych bezwodników *mezo*-aminą **5**.

Badania rozpocząłem od próby otrzymania pochodnej **289**. Jednak w reakcji aminy **5** z czterema ekwiwalentami bezwodnika bursztynowego **286** w toluenie otrzymałem jedynie ślady pożądanego produktu **289**. Stopniowe zwiększanie ilości bezwodnika do 25 ekwiwalentów pozwoliło na wydzielenie *mezo*-amidu **289** z wydajnością 11% (Tabela 8, wiersz 1). Reakcje otwierania bezwodników katalizowane są aminami trzeciorzędowymi.<sup>162</sup> Dodatek DIPEA, w równomolowej ilości w odniesieniu do bezwodnika **286**, spowodował zwiększenie wydajności reakcji amidowania do 34%. Ostatecznie, przedłużenie czasu reakcji pozwoliło mi na wydzielenie produktu **289** z wydajnością 53% (wiersz 6). Zarówno zwiększenie ilości bezwodnika **286** użytego do reakcji, jak i zmiana stosunku molowego dodatek/bezwodnik, powodowało obniżenie wydajność reakcji. Opracowane warunki reakcji zastosowałem w reakcji aminy **5** z bezwodnikiem glutarowym **287** oraz diglikolowym **288**. Najbardziej reaktywny okazał się bezwodnik diglikolowy **288**, który przereagował z *mezo*-aminą **5** w ciągu 30 minut (wydajność 82%). Bezwodnik glutarowy **288** również reagował szybciej niż bursztynowy **286** (14 godzin), jednak wydajność otrzymanego produktu była niższa (45%).

Tabela 8. Otwieranie cyklicznych bezwodników kwasów karboksylowych *mezo*-aminą **5**.

Lp.	Bezwodnik	Dodatek	Dodatek/bezwodnik	Czas [godz.]	Wydajność amidów [%]
1	<b>286</b>	–	–	24	11
2	<b>286</b>	Pirydyna	1	3	9
3	<b>286</b>	DMAP	1	0.1	25
4	<b>286</b>	DIPEA	1	0.5	34
5	<b>286</b>	DMAP	4	5	12
6	<b>286</b>	DIPEA	1	24	53
7(a)	<b>286</b>	DIPEA	1	24	42
8	<b>286</b>	DIPEA	1.5	24	46
9(b)	<b>286</b>	DIPEA	1	48	43
10(c)	<b>286</b>	DIPEA	1	24	29
11	<b>288</b>	DIPEA	1	0.5	82
12	<b>287</b>	DIPEA	1	14	45

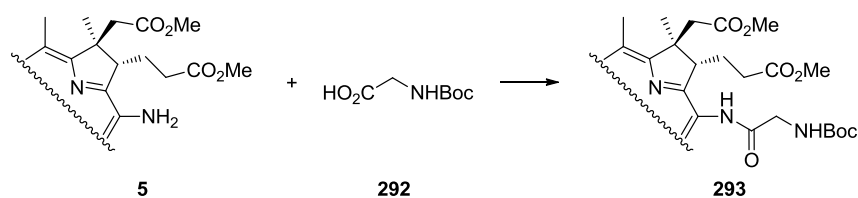
Warunki reakcji: Amina **5**, bezwodnik kwasowy (25 ekwiw.), bezwodnik toluen, reakcja prowadzona w atmosferze argonu, 50 °C. (a) Bezwodnik kwasowy (50 ekwiw.). (b) Temperatura pokojowa. (c) Bezwodnik kwasowy (10 ekwiw.).

Hydrofobowe pochodne kwasu kobyrinowego posiadające terminalną grupę karboksylową bardzo trudno jest w pełni zanalizować. Powodem tego jest prawdopodobnie oddziaływanie kwasowej grupy z atomem kobaltu. W takiej sytuacji pojawia się równowaga, która powoduje poszerzenie sygnałów w widmach NMR, które nie nadają się do interpretacji.<sup>163</sup>

### 3.3.2. Reakcje amidowania w pozycji *mezo*-

Wydajną i ogólną metodą otrzymywania amidów z amin i kwasów karboksylowych jest reakcja przy użyciu odczynników sprzęgających.<sup>164</sup> W celu opracowania warunków reakcji sprzęgania *mezo*-aminy **5** z kwasami karboksylowymi wybrałem, jako związek modelowy, *N*-Boc-glicynę (Tabela 9).

Tabela 9. Reakcje sprzęgania *mezo*-aminy **5** z Boc-Gly-OH.

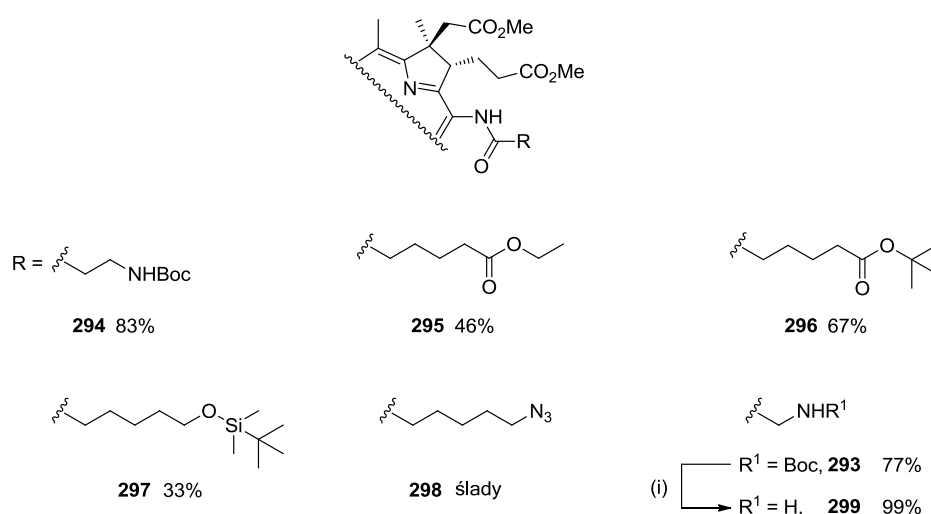


Lp.	Odcz. sprzęgający	Stosunek molowy odcz. sprz./amina	Czas [godz.]	Wydajność [%]
1	EDC·HCl	4	3	39
2(a)	HBTU	3	48	n. w.
3	DEPC	4	48	n. w.
4	EDC·HCl	1	3	9
5(b)	EDC·HCl	4	3	19
6	EDC·HCl	10	3	42
7	EDC·HCl	4	5	40
8(c)	EDC·HCl	4	5	29
9	EDC·HCl	4	16	58
10(b)	EDC·HCl	4	24	32
11(d)	EDC·HCl	4	24	Ślady
12	DCC	4	5	77

Warunki reakcji: Amina **5**, *N*-Boc-Gly-OH (4 ekwiw.), DCM, temperatura pokojowa. (a) Reakcja w DMF, HOBt (4 ekwiw.). (b) Jako substrat użyto akwakompleksu aminy **5**. (c) TEA (4 ekwiw.). (d) DMAP (4 ekwiw.). n. w. – nie wykryto.

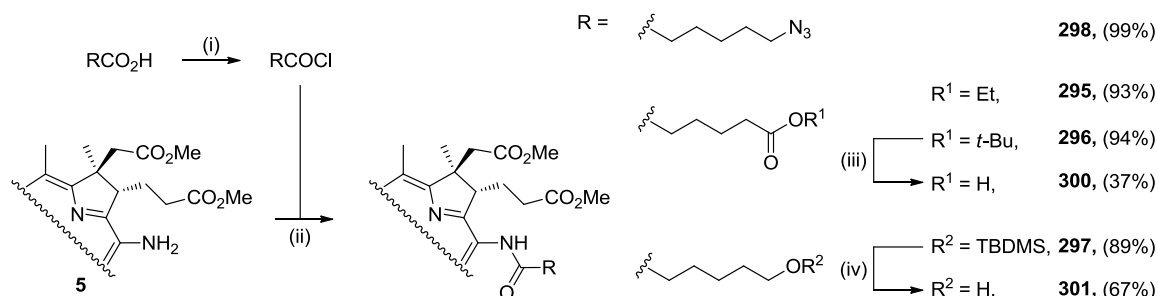
Badania rozpocząłem od przetestowania efektywności różnych odczynników sprzęgających.<sup>164</sup> Reakcja prowadzona w obecności EDC·HCl, jako jedyna, dała pożądany produkt (Tabela 9, wiersz 1), stąd w kolejnych eksperymentach stosowałem wyłącznie ten odczynnik. Wydłużenie czasu reakcji do 16 godzin spowodowało wzrost wydajności (wiersz 9). Zastosowanie jako substratu akwakompleksu *mezo*-aminy **5** skutkowało niższymi wydajnościami (wiersze 5 i 10). Zmiany ilości reagentów miały tylko niewielki wpływ na

ilość powstającego produktu. Dodatek trzeciorzędowych amin powodował znaczące obniżenie wydajności (wiersze 8 i 11). Zastąpienie EDC·HCl innym karbodiimidem (DCC) spowodowało znaczące przyspieszenie reakcji i zwiększenie wydajności (77%). Jako optymalne warunki sprzęgania *mezo*-aminy **5** z *N*-Boc-glicyną **292** przyjąłem ostatecznie: *N*-Boc-glicyna (4 ekwiw.), DCC (4 ekwiw.), DCM, temperatura pokojowa, 5 godzin. Stosując opracowane warunki reakcji otrzymałem serię *mezo*-amidowych pochodnych **293-297** (Rysunek 20). Związki te można również otrzymać przy użyciu EDC·HCl, lecz wydajności poszczególnych reakcji były niższe ze względu na niską konwersję.



Rysunek 20. Produkty sprzęgania aminy **5** z kwasami karboksylowymi w obecności DCC. (i) TFA, Et<sub>3</sub>SiH, DCM.

Ostatnią metodą, którą przetestowałem była reakcja *mezo*-aminy **5** z chlorkami kwasowymi (Schemat 59). Zastosowana przeze mnie technika *one-pot* pozwoliła na uniknięcie wydzielania chlorków kwasowych. Kluczowym elementem, od którego zależało powodzenie reakcji sprzęgania, było dokładne pozbycie się nadmiaru chlorku oksalilu wraz z rozpuszczalnikiem, przed dodaniem aminy **5**.



Schemat 59. Reakcje sprzęgania *mezo*-aminy z kwasami karboksylowymi przy użyciu chlorku oksalilu. (i) (COCl)<sub>2</sub>, DCM, DMF<sub>(kat.)</sub>, 15 min; (ii) DCM, 2 godz.; (iii) TFA, Et<sub>3</sub>SiH, DCM, 60 min.; (iv) THF, TBAF, 6 godz.

*mezo*-Ester *tert*-butylowy **296** poddałem hydrolizie kwasem trifluorooctowym. W ten sposób otrzymałem analogi związków otrzymywanych w reakcji otwierania bezwodników (Schemat 59). W celu syntezy pochodnej **301** posiadającej terminalną grupę hydroksylową,

związek **297** poddałem działaniu fluorku tetra-*n*-butyloamoniowego (67%). Z kolei grupę Boc- usunąłem stosując TFA w obecności trietylosilanu, otrzymałem aminę **299** w postaci chromatograficznie czystej (Rysunek 20).

Opracowane przeze mnie metody sprzęgania *mezo*-aminy **5** z kwasami karboksylowymi pozwoliły na syntezę szeregu *mezo*-amidów **293-301**. Reakcje prowadzone przy użyciu odczynników sprzęgających pozwoliły na otrzymanie prostych amidów **293-297**. Z kolei, związki **295-298**, których nie udało się otrzymać z zadowalającymi wynikami przy pomocy odczynników sprzęgających, otrzymałem w reakcji chlorków kwasowych z aminą **5**. Związki te zostały przesłane do laboratorium w Houston w celu przeprowadzenia badań biologicznych.

### 3.4. Laktam

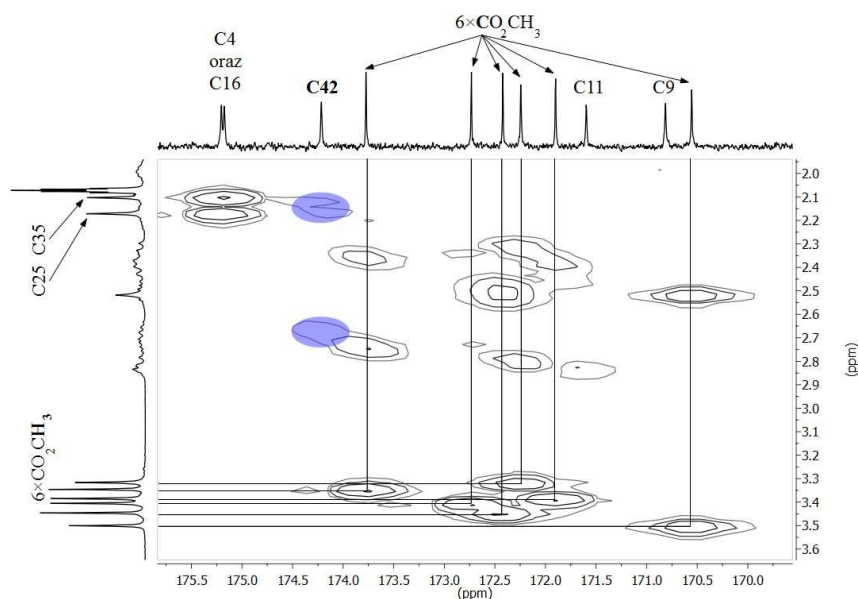
W reakcjach sprzęgania aminy **5** z kwasami karboksylowymi, prowadzonych w obecności EDC·HCl, zauważyłem tworzenie się produktu ubocznego ( $m/z = 1045$ ). Ten sam związek powstawał również w reakcji aminy **5** z bezwodnikami (patrz rozdział 3.3.1). Produkt ten wydzieliłem i określiłem jego strukturę na podstawie dwuwymiarowych widm NMR (COSY, HSQC, HMBC). Otrzymanym związkiem była pochodna kwasu kobyrynowego **302**, posiadająca siedmioczłonowy pierścień laktamu, który tworzył się w wyniku wewnątrzcząsteczkowej reakcji grupy estrowej w pozycji *d*- oraz grupy aminowej w pozycji *mezo*- (Rysunek 22).

#### 3.4.1. Określenie struktury

W widmie spektrometrii mas zaobserwowałem parę sygnałów pseudomolekularnych  $[M-CN]^+$  oraz mniej intensywny  $[M+Na]^+$ , odpowiednio o  $m/z = 1045$  oraz 1094. Zaobserwowany zestaw sygnałów, różniących się o 49 Da, jest często obserwowany w przypadku pochodnych kwasu kobyrynowego i pozwala, w pośredni sposób, na określenie  $m/z$  jonu molekularnego (1071). W widmie HRMS znaleziona wartość dla sygnału jonu pseudomolekularnego  $[M-CN]^+$  wynosiła  $m/z = 1045.4447$  i była zgodna z obliczoną wartością  $m/z$  z dokładnością 0.2 mDa (0.2 ppm).

W widmie  $^1H$  NMR charakterystyczny sygnał przy 8.03 ppm przypisałem protonowi amidowemu. Ponadto, zaobserwowałem jedynie sześć singletów w zakresie 3.3-3.6 ppm odpowiadających protonom grup metylowych  $CO_2CH_3$ . W widmie  $^{13}C$  NMR w zakresie 170-176 ppm znajdowało się 11 sygnałów. Siedem z nich odpowiadało węglom

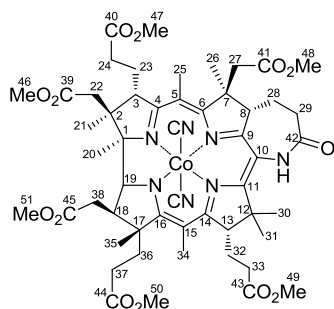
karbonylowym, natomiast pozostałe cztery pochodziły od czwartorzędowych węgli pierścienia koryny (C4, C9, C11 oraz C16).



Rysunek 21. Fragment widma HMBC mezo-laktamu **302** wykonane w toluenie- $d_6$ .

Sześć sygnałów pochodzących od C=O grup estrowych łatwo było przypisać, ponieważ w widmie HMBC widoczne były sygnały korelacyjne z sygnałami pochodzącymi od protonów grup  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ . Dwa sygnały pochodzące od węgli C4 (175.18 ppm) oraz C16 (175.20 ppm) korelowały z sygnałami protonów przy węglach C25 oraz C34, które w widmie  $^1\text{H}$  NMR są charakterystycznymi singletami, występującymi w zakresie 2.0-2.2 ppm. Sygnały

pochodzące od węgli C9 (170.8 ppm) oraz C11 (171.6 ppm) przypisałem dzięki korelacjom z sygnałami protonów położonych odpowiednio przy węglach C8 (3.87 ppm) oraz C13 (2.83 ppm). Ostatni sygnał w omawianym zakresie widma  $^{13}\text{C}$  NMR (174.2 ppm) pochodził od poszukiwanego węgla karbonylowego C42, czego dowodzą sygnały korelacyjne z sygnałami protonów przy węglach C28 i C29 (1.48, 2.14 oraz 2.67 ppm) wyróżnione niebieskim kolorem na widmie HMBC (Rysunek 21).



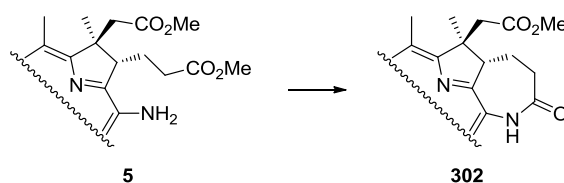
Rysunek 22. Struktura i numeracja laktamu **302**.

### 3.4.2. Optymalizacja syntezy laktamu **302**

Laktamy ulegają reakcjom, które mogą przebiegać z rozerwaniem wiązania C–N, N–CO lub C–CO.<sup>165</sup> Stosunkowo łatwo pierścień laktamu może zostać otwarty w reakcji z nukleofilami, następuje wówczas rozerwanie wiązania N–CO. W świetle powyższych informacji uznałem, że laktam **302** może być użytecznym substratem do selektywnych

modyfikacji w pozycji *d*-. Badania rozpocząłem od opracowania wydajnej metody otrzymania tego związku (Tabela 10).

Tabela 10. Synteza laktamu **302**.



Lp.	Kwas	Stężenie kwasu [%]	Rozpuszczalnik	Czas [godz.]	Wydajność laktamu <b>302</b> [%]
1	HCl	4	MeOH	7	45
2	HCl	5	MeOH	7	46
3	HCl	8	MeOH	7	48
4	HCl	20	MeOH	7	12
5	TFA	0.3	DCM	3	63
6	TFA	0.35	DCM	5	82
7	TFA	0.5	DCM	5	79

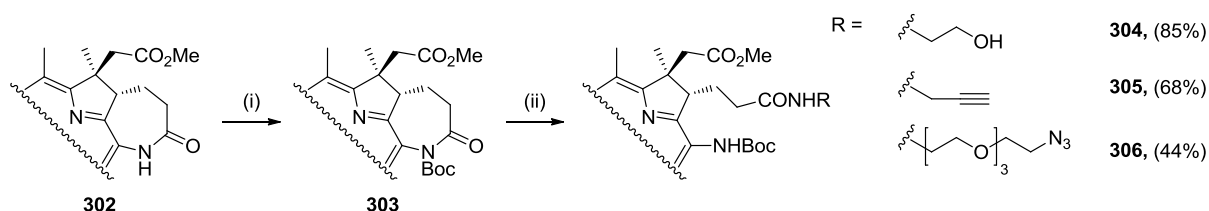
Warunki reakcji: Amina **5** (0.01 mmol), rozpuszczalnik (1 mL), temperatura pokojowa. n. w. – nie wykryto.

Wiadomo, że niektóre pochodne kwasu kobyrinowego są wrażliwe na działanie temperatury, dlatego też, w pierwszym etapie badań sprawdziłem stabilność aminy **5** w podwyższonej temperaturze. Ogrzewanie roztworu aminy **5** w toluenie, w temperaturze 50 °C powodowało niewielki rozkład substratu. Laktam **302** był produktem ubocznym reakcji opisanych w poprzednich rozdziałach, stwierdziłem więc, że jego powstawanie mogło być spowodowane reakcją z któryś z odczynników używanych w tych przemianach. Postanowiłem zbadać wpływ TEA, KCN, Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>CN<sup>-</sup> i EDC·HCl na aminę **5**. W żadnym przypadku nie zaobserwowałem tworzenia się pożądanego produktu **302**. Z kolei, reakcja aminy **5** z HCl (8% w MeOH) dawała laktam **302** z wydajnością 48% (Tabela 10, wiersz 3), natomiast zmiana stężenia HCl miała znikomy wpływ na przebieg reakcji. Laktam **302** tworzył się ze znacznie lepszą wydajnością w obecności TFA (wiersze 5-7). Najlepsze rezultaty osiągnąłem stosując cztery ekwiwalenty tego kwasu jako roztwór w DCM (stężenie roztworu – 0.35%).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziłem że, laktam **302** tworzył się w katalizowanej kwasem reakcji amidowania. Najlepszymi warunkami syntezy tego związku były: 0.35% roztwór TFA w DCM (4 ekwiwalenty kwasu), temperatura pokojowa, czas reakcji 5 godzin.

### 3.4.3. Modyfikacja pozycji *d*- poprzez otwieranie pierścienia laktamu **303**

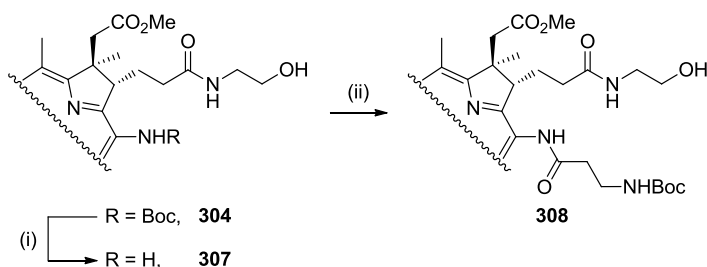
Jedną z metod wykorzystania laktamów jako bloków budulcowych jest reakcja otwierania pierścienia nukleofilami. Jako modelowy nukleofil wybrałem etanoloaminę. Niestety, w pierwszej reakcji laktamu **302** z etanoloaminą odzyskałem nieprzereagowany substrat. Z danych literaturowych wynika, że zabezpieczenie grupy NH laktamu, na przykład grupą Boc-, ułatwia rozerwanie wiązania N–CO,<sup>165</sup> stąd postanowiłem otrzymać Boc-pochodną laktamu **303**.



Schemat 60. Synteza amidów w pozycji *d*-. (i) (Boc)<sub>2</sub>O, DMAP, DCM, 23 godz., 73%; (ii) RNH<sub>2</sub>, NaCN, TEA, DMF, 24 godz.

Rozpuszczony w DCM laktam **302** poddałem reakcji z Boc<sub>2</sub>O w obecności DMAP, otrzymując zabezpieczony związek **303** (Schemat 60). Reakcja pochodnej **303** z etanoloaminą dawała śladowe ilości amidu **304**. Podlech i współpracownicy wykazali, że reakcje otwierania laktamu katalizowane są azydkiem sodu.<sup>166-168</sup> Dodatek NaN<sub>3</sub> poprawił nieco wydajność tej reakcji. Pożądaný produkt **304** otrzymałem z wydajnością 28% (3 dni). Palomo i współpracownicy, w analogicznej reakcji używali cyjanku sodu jako katalizatora.<sup>169</sup> Stwierdziłem, że użycie NaCN przyspieszyło reakcję (czas reakcji 24 godziny) oraz korzystnie wpłynęło na wydajność reakcji (85%). Zgodnie z opracowaną procedurą przeprowadziłem reakcje laktamu **303** z propargiloaminą oraz 2-(2-(2-(2-azydoetoksy)etoksy)etoksy)etyloaminą, otrzymując zmodyfikowane w pozycji *d*- pochodne **305** i **306**, z wydajnościami odpowiednio 68 i 44%. Opracowana metoda jest dogodną drogą modyfikacji pochodnych kwasu kobyrynowego w pozycji *d*-.

Amid **304** poddałem dalszym modyfikacjom (Schemat 61). W pierwszej kolejności



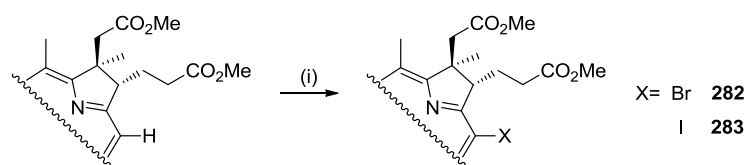
Schemat 61. Synteza diamidów w pozycjach *d*- i *mezo*-. (i) TFA, Et<sub>3</sub>SiH, DCM, 61%; (ii) Boc-β-Ala-OH, EDC·HCl, DCM, 6 godz., 74%.

usunąłem grupę zabezpieczającą w reakcji pochodnej **304** kwasem trifluorooctowym w obecności trietylosilanu. W reakcji pochodnej **307** z Boc- $\beta$ -Ala-OH zastosowałem EDC·HCl, w obecności którego reakcja tworzenia amidów z aminy **5** biegła szybciej niż wobec DCC (patrz rozdział 3.3.2). Zastosowanie wcześniej opracowanych warunków syntezy amidów pozwoliło mi na otrzymanie pochodnej **308** z wydajnością 74%. Związek ten był pierwszą diamidową pochodną kwasu kobyrynowego selektywnie zmodyfikowaną w pozycjach *d*- i *mezo*-.

Otrzymanie *mezo*-laktamu **302** wyznaczyło nową drogę modyfikacji pochodnych kwasu kobyrynowego w pozycji *d*-. Dodatkowo, zastosowanie tego laktamu jako substratu umożliwia selektywne wprowadzanie grup funkcyjnych również w pozycję *mezo*-. Otrzymane związki zostały przebadane w laboratorium w Houston, a ich zdolność do aktywacji sGC pomogła ustalić, jak istotną rolę w tym procesie odgrywają modyfikacje w pozycji *d*-.

### 3.5. Próby reakcji sprzęgania w pozycji *mezo*- przy użyciu katalizatorów metali przejściowych

Dobrze znanymi i łatwo dostępnymi pochodnymi kwasu kobyrynowego są związki posiadające w pozycji *mezo*- atom chlorowca. Wiązanie C–X (gdzie X to halogen) jest stosunkowo słabe, właściwość tą wykorzystuje się w wielu reakcjach tworzenia nowych wiązań C–C. Najczęściej do aktywacji wiązania C–X, stosuje się związki metali



Schemat 62. Synteza *mezo*-halogenków. (i) NXS, AcOH, 30 min, X = Br (89%), X = I (79%).

przejściowych, spośród których głównie używane są związki palladu. W oparciu o powyższe informacje, postanowiłem spróbować

zmodyfikować pochodne kwasu kobyrynowego w tego typu reakcjach.

Opisana w literaturze metoda syntezy jodku **283** jest mało wydajna (54%) i czasochłonna (2 dni).<sup>150</sup> Zastosowanie kompleksu dicyjankowego zamiast akwakompleksu oraz użycie większego nadmiaru *N*-jodosukcynoimidu, pozwoliło mi otrzymać pożądaną związek **283** w krótszym czasie (30 min) i ze znacznie większą wydajnością (79%) (Schemat 62).





### 3.5.2. Charakterystyka alkinu **310**

Pomimo przeprowadzenia licznych prób syntezy pochodnych sfunkcjonalizowanych w pozycji *mezo*-, w warunkach reakcji Sonogashiry nie otrzymałem pożądanego produktu **309**, tworzył się natomiast związek **310** (Rysunek 23).

W widmie spektrometrii mas zaobserwowałem dwa sygnały: najintensywniejszy o  $m/z = 1217.9$  przypisałem jonowi pseudomolekularnemu  $[M-CN]^+$  oraz  $m/z = 1266.6$ ,  $[M+Na]^+$ . Profil izotopowy obu sygnałów świadczył o obecności atomu bromu. W widmie IR zaobserwowałem pasmo przy  $\nu = 2112 \text{ cm}^{-1}$ , potwierdzające obecność potrójnego wiązania węgiel-węgiel.

W widmie  $^1\text{H}$  NMR w zakresie 7.1-6.7 ppm znajdują się sygnały charakterystyczne dla jednopodstawionego pierścienia aromatycznego, obecne były również sygnały pochodzące od siedmiu grup estrowych  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ . Wnikliwa analiza widm NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i widm korelacyjnych) pozwoliła na przypisanie wszystkich sygnałów występujących w widmie  $^1\text{H}$  NMR (Rysunek 23). W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR nieprzypisane pozostały jedynie trzy sygnały – 135.1, 103.7 oraz 86.9 ppm, ponieważ nie korelowały one w eksperymencie HMBC z żadnymi sygnałami w widmie  $^1\text{H}$  NMR.

Tworzeniu się pochodnej **310** zawsze towarzyszyło pojawienie się śladowych ilości nieco mniej polarnego produktu, posiadającego bliźniaczo podobne widmo MS. Związkiem tym najprawdopodobniej był regioizomer związku **310** (grupa  $\text{PhC}\equiv\text{C}$  w pozycjach  $\alpha$  lub  $\beta$ ). Jak podaje literatura, regioizomery takie można rozdzielić.<sup>35,174</sup> Przesunięcia chemiczne sygnałów w widmach NMR regioizomerów różnią się, dlatego łatwo odnotować obecność drugiego regioizomeru w mierzonej próbce. W otrzymanych widmach związku **310** nie zaobserwowałem dodatkowych sygnałów.

Podsumowując, reakcje prowadzone w warunkach przewidzianych dla reakcji Sonogashiry prowadziły tylko do utworzenia wiązania C–Co.

Z badań prowadzonych w zespole XV IChO PAN wynika, że analogiczne acetylenkowe pochodne witaminy  $\text{B}_{12}$  są bardzo trwałe.<sup>175</sup> Stąd można wnioskować, że w przypadku heptaestru kwasu kobrynowego jest podobnie, a zatem fenyloacetylen łatwiej ulega konkurencyjnej reakcji tworzenia wiązania Co–C niż C–C w reakcji Sonogashiry. We wszystkich przypadkach nie obserwowałem pożądanego produktu **309**, dlatego ta droga syntetyczna została zarzucona.

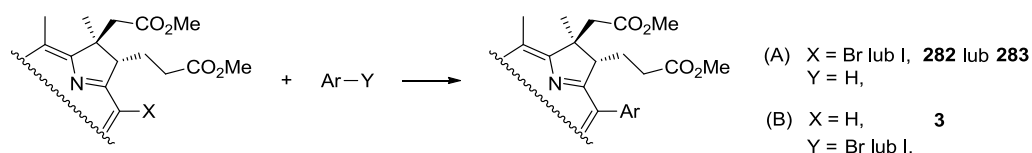
Tabela 11. Tabela zaobserwowanych sprzężeń w widmach dwuwymiarowych **310**.

Przypisanie	<sup>13</sup> C NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje		Przypisanie	<sup>13</sup> C NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje	
		HSQC [ppm]	HMBC			HSQC [ppm]	HMBC
C16	173.5		C35, C36*, C34, C19				
C4	173.3		C3, C23, C25, C24	C52	51.9	3.67	
C43	173.0		C32, C33, C50	C47	51.6	3.62	
C42	172.9		C28, C29*, C49	C46 lub C48	51.6	3.65	
C40	172.4		C24, C47	C46 lub C48	51.5	3.65	
C44	172.3		C37, C51	C51	51.4	3.61	
C45	172.2		C38, C52	C49	51.1	3.43	
C39	171.6		C22, C46	C50	50.8	3.20	
C11	170.6		C13, C30, C31	C12	49.7		C13, C30, C31
C41	170.4		C27, C48	C7	46.4		C25, C26, C27, C28*
C9	169.1		C27*, C28*, C8	C2	45.1		C3, C19, C20, C21, C22, C23
C6	162.4		C26, C25, C27*, C8	C27	42.1	2.76 oraz 2.19	C8, C26
C14	161.1		C34, C32*	C22	40.7	2.37	C3, C21
	135.0			C18	39**	2.71	C19, C20, C35, C36, C38
C56	130.2	6.79	C56, C57, C58	C24	33.0	2.47 oraz 2.56	C3, C23
C57	127.4	7.03	C56, C57	C36	31.7	1.78 oraz 2.30	C35, C37, C18
C55	127.3		C57	C38	31.0	2.64 oraz 2.79	C18, C19
C58	124.6	6.97	C56	C33	29.6	2.49	C32, C13
C5	105.1		C25	C29	29.4	2.44 oraz 2.52	C8, C28*
C54	104.5		C56	C37	29.1	2.12 oraz 2.55	C35, C36,
	103.6			C31	27.8	1.18	C13, C30
C15	102.8		C19, C34	C28 lub C32	25.3 lub 25.2	1.71 oraz 2.11 lub 1.62 oraz 1.91	C8, C13, C29, C33
	86.9			C23	24.0	1.89 oraz 2.12	C3, C24
C1	82.2		C21, C20, C22, C18, C19, C3	C20	23.2	1.53	C19
C19	74.5	3.69	C20, C38, C18	C30	23.1	1.59	C31
C17	57.5		C35, C36*, C38, C18	C26	18.7	1.58	C27
C3	56.2	3.48	C21, C23, C22, C24*, 2,58,	C35	18.0	1.18	C18
C8	55.4	4.03	C26, C28*, C27, C29*	C21	16.1	1.27	C22
C13	54.3	3.12	C30, C31, C32, C33	C25 oraz C34	15.5	2.16 oraz 2.15	C26

\*Zaobserwowano sprzężenie tylko z jednym z diastereotopowych protonów. \*\* Sygnał nakłada się z sygnałem rozpuszczalnika, stąd niemożliwe jest dokładne określenie wartości przesunięcia chemicznego.

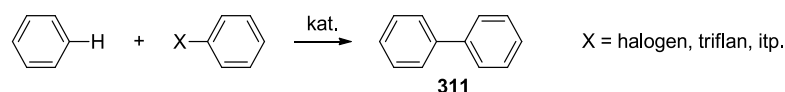
### 3.5.3. Próby bezpośredniego arylowania

W toku badań postanowiłem spróbować otrzymać pochodne kwasu kobyrynowego z podstawnikami aryłowymi w pozycji *mezo*-. Do tego celu planowałem zastosować reakcję bezpośredniego arylowania (Schemat 64). W tym przypadku, również istnieje możliwość utworzenia wiązania Co–Ar. Arylokobalamina jest związkiem znanym, lecz w przeciwieństwie do acetylenowej pochodnej, jest niestabilna. Stąd miałem nadzieję, że uniknę konkurencyjnych reakcji tworzenia wiązania Co–C. Ponadto, użycie reakcji bezpośredniego arylowania do modyfikacji pochodnych kwasu kobyrynowego uznałem za wartościowe, ponieważ umożliwiłoby sfunkcjonalizowanie tego związku w pozycji *mezo*-, w jednym etapie syntetycznym. Spodziewany produkt powinien posiadać rozszerzony chromofor, zatem pasma widma UV/Vis powinny być przesunięte batochromowo, a kolor produktu powinien ulec zmianie.



Schemat 64. Dwie koncepcje bezpośredniego arylowania (A) halogenków estru metylowego **282** lub **283** (B) estru metylowego kwasu kobyrynowego **3**.

Związki biarylowe są klasą związków o bardzo dużym znaczeniu, wiązanie aryl–aryl często występuje w strukturze wielu związków biologicznie czynnych. Spośród metod syntezy tych związków, jednymi z najistotniejszych są reakcje sprzęgania katalizowane metalami przejściowymi (głównie solami palladu) – reakcje Suzuki,<sup>176</sup> Stille,<sup>177</sup> Kumady<sup>178</sup> i Negishi.<sup>179</sup> Jednakże wymagają one często przygotowania odpowiednio sfunkcjonalizowanych substratów. Alternatywą dla powyższych reakcji jest tzw. bezpośrednie aryłowanie (Schemat 65). Metodologia ta została odkryta stosunkowo niedawno i posiada jeszcze wiele niedoskonałości.<sup>180</sup> Niemniej jednak obserwuje się znaczący postęp i obecnie opracowywane metody pozwalają na prowadzenie reakcji w łagodnych warunkach.



Schemat 65. Reakcja bezpośredniego arylowania.

Pierwsze próby arylowania przeprowadziłem stosując halogenki estru metylowego kwasu kobyrynowego **282** i **283** (Schemat 64, wariant A). Najczęściej stosowanym katalizatorem w tej reakcji jest octan palladu, dlatego w moich badaniach był on podstawowym katalizatorem.

Tabela 12. Próby bezpośredniego arylowania *mezo*-halogenków **282** i **283**.

Lp.	Halogenek	Związek aromatyczny	Ligand	Zasada	Dodatek	Rozpuszczalnik
1	<b>283</b>	Benzimidazol	PPh <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	–	DMF
2	<b>283</b>	Benzotiazol	PPh <sub>3</sub>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	CuI	DMF
3	<b>283</b>	<i>N</i> -tlenek <i>p</i> -nitropirydyny	PCy <sub>3</sub> ·HBF <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,4-Dioksan
4	<b>282</b>	Benzen	DavePhos®	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	–	DMF
5	<b>282</b>	Toluen	PPh <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PivOH	DMA
6	<b>282</b>	Nitrobenzen	DavePhos®	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	–	DMF
7	<b>282</b>	Nitrobenzen	DavePhos®	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PivOH	DMF

Warunki reakcji: halogenek (14 μmol), związek aromatyczny (2 ekwiw.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (20% mol.), ligand (40% mol.), zasada (2 ekwiw.), dodatek (1 ekwiw.), rozpuszczalnik (0.2 mL), 80 °C, 24 godz.

Badacze włoscy wykazali, że benzimidazol reaguje z halogenkami aryłowymi w obecności octanu palladu i trifenylofosfiny.<sup>181</sup> Prowadząc reakcję związku **283** z benzimidazolem w analogicznych warunkach zaobserwowałem wyłącznie rozkład jodku **283** (Tabela 12, wiersz 1). Kolejną metodą, którą przetestowałem była opisana przez Fagnou reakcja sprzęgania *N*-tlenków pirydynowych z halogenkami aryłowymi w obecności węgla srebra (wiersz 3).<sup>182</sup> W reakcji jodku **283** z *N*-tlenkiem *p*-nitropirydyny ponownie zaobserwowałem tylko rozkład substratu. Fagnou wykazał, że stosowanie zatłoczonych biarylowych fosfin (np. DavePhos®) w reakcji bezpośredniego arylowania często korzystnie wpływa na wydajność reakcji.<sup>183</sup> Jednak przełomem w jego badaniach było użycie, jako dodatków, prostych kwasów karboksylowych (głównie kwasu piwalowego). Postulowano, że uczestniczą one w tworzeniu stanu przejściowego, znacząco obniżając energię wiązania C–H.<sup>184</sup> Niestety, pomimo zastosowania obu z wymienionych dodatków, nie zaobserwowałem tworzenie się pożądanego produktu. Konwersja we wszystkich wyżej opisanych reakcjach była bardzo niska, a wśród produktów nie zaobserwowałem pożądanego produktu reakcji.

Równolegle prowadziłem reakcje estru metylowego kwasu kobyrynowego z halogenkami aryłowymi (Schemat 64, wariant B). Na początku sprawdziłem metodę zaproponowaną przez Fagnou, w której kluczowym dodatkiem był kwas piwalowy. Heptaester **3** w roztworze zawierającym katalizator, PPh<sub>3</sub> i kwas piwalowy w temperaturze 80 °C rozkłada się bardzo szybko (Tabela 13, wiersz 1). Po obniżeniu temperatury do 50 °C rozkład substratu był bardzo powolny, dlatego też uznałem podjęcie dalszych prób w tych warunkach za zasadne. Przetestowałem różne warianty tej reakcji, ale niezależnie od zastosowanych warunków, nie zaobserwowałem tworzenia się pożądanego produktu, liczne były natomiast produkty rozkładu substratu (w widmie MS nie było sygnałów o *m/z* > od substratu) (Tabela 13).

Tabela 13. Próby bezpośredniego arylowania heptaestru **3** wspomaganego kwasem piwalowym.

Lp.	Substrat	Zasada	Ligand	Rozpuszczalnik
1 <sup>(a)</sup>	–	–	–	DMF
2	Bromobenzen	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PPh <sub>3</sub>	DMA
3	Bromobenzen	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PPh <sub>3</sub>	DMF
4	Bromobenzen	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PCy <sub>3</sub> ·HBF <sub>4</sub>	DMF
5	Bromobenzen	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PCy <sub>3</sub> ·HBF <sub>4</sub>	DMA
6	<i>p</i> -Nitrobromobenzen	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DavePhos®	DMF
7	<i>p</i> -Nitrobromobenzen	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DavePhos®	DMF
8	<i>p</i> -Nitrobromobenzen	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PPh <sub>3</sub>	DMF
9	<i>p</i> -Nitrobromobenzen	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PPh <sub>3</sub>	DMF
10	<i>p</i> -Metoksybromobenzen	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DavePhos®	DMF

Warunki reakcji: heptaester **3** (14 μmol), substrat (2 ekwiw.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (20% mol.), ligand (40% mol.), kwas piwalowy (40% mol.), zasada (2 ekwiw.), dodatek (1 ekwiw.), rozpuszczalnik (0.2 mL), 50 °C, 24 godz.; (a) 80 °C, 16 godz.

Sharp zaproponował ciekawą metodę sprzęgania furanów oraz tiofenów z bromkami aryłowymi.<sup>185</sup> W zależności od użytego układu katalitycznego reakcja przebiegała z różną regioselektywnością. W reakcji heptaestru **3** z bromobenzenem wypróbowałem dwie metody (Tabela 14, wiersze 1 i 3). Niestety próby te, jak i ich modyfikacje, zakończyły się niepowodzeniem. W podobnych warunkach, do tych opracowanych przez Gevorgyana dla indolizyn, również nie obserwowałem powstawania arylowanej pochodnej kwasu kobyrynowego (wiersz 4).<sup>186</sup> Scott opracował warunki reakcji, w których jako zasadę stosował DBU oraz katalizator – Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>/P(*t*-Bu)<sub>3</sub>. Przeprowadził on kaskadowo reakcję Suzuki, a następnie bezpośrednie arylowanie.<sup>187</sup> Warunki te okazały się jednak zbyt drastyczne dla heptaestru **3**, który pod wpływem DBU rozkładał się. Wykonałem reakcje testowe, w których heptaester **3** poddałem działaniu różnych zasad, w celu ustalenia, które z nich nie powodują rozkładu substratu. Zasadą spełniającą to kryterium, okazał się *tert*-butanolan sodu. Niestety, przeprowadzone reakcje jodobenzenu z heptaestrem **3** w obecności *tert*-butanolanu sodu, w różnych rozpuszczalnikach, nie doprowadziły do otrzymania nawet śladowych ilości pożądanego produktu (wiersze 6 i 8). W toku dalszych badań wykorzystałem metodę opracowaną przez Mori i współpracowników.<sup>188</sup> Badacze japońscy zasugerowali, że w reakcji sprzęgania tiofenów z jodoarenami, w obecności AgNO<sub>3</sub>/KF, *in situ*, generuje się fluorek srebra(I), a ten z kolei ma istotny wpływ na przebieg reakcji, pozwala na obniżenie temperatury procesu do temperatury pokojowej. Niestety, w analogicznych warunkach reakcja heptaestru **3** z jodobenzenem nie dała pożądanego produktu sprzęgania (wiersz 9).

Tabela 14. Próby arylowania heptaestru **3**.

Lp.	Substrat	Katalizator	Ligand	Zasada	Rozpuszczalnik
1	Bromobenzen	Pd/C		KOAc	NMP
2	Bromobenzen	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>		KOAc	NMP
3	Bromobenzen	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>		KOAc	Toluen
4 <sup>(a)</sup>	Bromobenzen	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		KOAc	NMP
5	Jodobenzen	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	P( <i>t</i> -Bu) <sub>3</sub>	KOAc	DMA
6	Jodobenzen	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	P( <i>t</i> -Bu) <sub>3</sub>	NaOt-Bu	DMA
7	Jodobenzen	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	P( <i>t</i> -Bu) <sub>3</sub>	DBU	DMA
8	Bromobenzen	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	X-Phos®	NaOt-Bu	Toluen
9 <sup>(b)</sup>	Jodobenzen	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		KF	DMSO

Warunki reakcji: heptaester **3** (14 μmol), substrat (2 ekwiw.), katalizator (20% mol.), ligand (40% mol.), zasada (2 ekwiw.), rozpuszczalnik (0.2 mL), 80 °C, 24 godz. (a) H<sub>2</sub>O (1 ekwiw.). (b) AgNO<sub>3</sub> (1 ekwiw.).

Zestawione powyżej reakcje są reprezentatywną częścią przeprowadzonych badań. Pomimo wielu prób nie udało mi się otrzymać pożądanego produktu sprzęgania. Niemniej jednak wśród tworzących się produktów zaobserwowałem takie, które stały się obiektem bardziej wnikliwych badań.

### 3.5.4. Próby arylowania solami diarylojodoniowymi

Pionierskie prace Sanford, poświęcone reakcjom wykorzystującym związki hiperwalencyjnego jodu, wniosły nową jakość do chemii organicznej.<sup>189,190</sup> Opracowano, między innymi, katalizowaną związkami palladu metodologię tworzenia wiązania aryl–aryl, w której cykl katalityczny biegnie przez układ Pd(II)/Pd(IV). Reakcje te prowadzi się w temperaturze pokojowej, co jest pożądanym z punktu widzenia obserwowanych w poprzednich próbach arylowania reakcji ubocznych. W literaturze opisano również wiele modyfikacji tej procedury. Gaunt wykazał, że możliwe jest zastąpienie soli palladu(II) solami miedzi(II). Wówczas, postulowany cykl katalityczny, przebiega przez układ Cu(I)/Cu(III). Zakłada się, że etap rozerwania wiązania aryl–H katalizowany jest związkami miedzi(III), które są dużo bardziej elektrofilowe niż związki palladu(II), w związku z tym etap ten zachodzi dużo szybciej.

Badania rozpocząłem od reakcji triflanu difenylojodoniowego z heptaestrem **3** w warunkach opisanych przez Sanford (Tabela 15, wiersz 1).<sup>189</sup> Po 48 godzinach nie zaobserwowałem postępu reakcji, mimo dodawania kolejnych porcji soli diarylojodoniowej oraz podwyższenia temperatury reakcji do 50 °C.

Tabela 15. Wybrane próby reakcji heptaestru **3** z triflanem difenylojodoniowym.

Lp.	Katalizator	Zasada	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]
1(a)	Pd(OAc) <sub>2</sub>	–	AcOH	Pokojowa
2	Cu(OTf) <sub>2</sub>	–	DCM	40
3(b)	Cu(OTf) <sub>2</sub>	–	DCE	70
4	–	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	80

Warunki reakcji: ester **3** (14 μmol), [Ph<sub>2</sub>I]<sup>+</sup>OTf<sup>-</sup> (2 ekwiw.), katalizator (20% mol.), zasada (2 ekwiw.), rozpuszczalnik (1 mL), 24 godz. (a) Po 24 godzinach zwiększono temperaturę do 50 °C oraz dodano [Ph<sub>2</sub>I]<sup>+</sup>OTf<sup>-</sup> (1 ekwiw.). (b) Po 24 godzinach dodano katalizatora (1 ekwiw.) oraz [Ph<sub>2</sub>I]<sup>+</sup>OTf<sup>-</sup> (1 ekwiw.).

Kolejną próbą była reakcja heptaestru **3** z triflanem diarylojodoniowym, w warunkach opisanych przez Gaunta i współpracowników.<sup>191,192</sup> Katalizatorem reakcji indolu z [Ph<sub>2</sub>I]<sup>+</sup>OTf<sup>-</sup> był triflan miedzi(II), a dodatek zasady pozwalał uniknąć ubocznej reakcji dimeryzacji indolu. Opisana metoda dawała dobre wyniki, zwłaszcza dla związków bogatych w elektrony, posiadających podstawniki metoksyłowe w pierścieniu benzenowym. Metoda ta pozwoliła na otrzymanie pochodnych indolu arylowanych w pozycji C3. Heptaester **3** łatwo ulega reakcji nitrowania w pozycji *mezo*-, stąd założyłem, że jest ona bogata w elektrony. Heptaester **3** nie reagował jednak z triflanem difenylojodoniowym w obecności triflanu miedzi(II), zarówno w DCM (40 °C) jak i DCE (70 °C) (wiersze 2 i 3). Po 24 godzinach w mieszaninie pozostawał nieprzereagowany substrat. Dodanie kolejnej porcji katalizatora oraz soli diarylojodoniowej prowadziło jedynie do niewielkiego rozkładu substratu.

Z kolei, Zhang opisał reakcję sprzęgania piroli i pirydyn z solami diarylojodoniowymi.<sup>193</sup> Zgodnie z procedurą, kluczowym w tej reakcji było zastosowanie zasady (np. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) oraz podwyższonej temperatury. Co ciekawe, dodatek katalizatora w postaci soli metalu przejściowego (np. octanu palladu), nie był wymagany. Praca Zhanga zawierała liczne przykłady arylowania związków heterocyklicznych, lecz zastosowanie opracowanych warunków nie pozwoliło mi otrzymać pożądanej pochodnej kwasu kobyrynowego.

### 3.5.5. Podsumowanie

W tej części pracy opisałem reprezentatywne próby przeprowadzenia reakcji pochodnych kwasu kobyrynowego ze związkami aryłowymi. Warunki reakcji dobrane zostały na podstawie danych o reaktywności substratów oraz unikaniu stosowania wysokich temperatur, mocnych kwasów i zasad, itd. Choć bezpośredni cel, w postaci opracowania metody syntezy pochodnych zmodyfikowanych w pozycji *mezo*-, nie został osiągnięty, to przeprowadzone przeze mnie badania dostarczyły wielu informacji na temat reaktywności pochodnych kwasu kobyrynowego wobec zastosowanych reagentów. Podstawowy katalizator



– octan palladu(II) – powodował powolny rozkład heptaestru **3** już w temperaturze pokojowej. Inne katalizatory mogły być stosowane jedynie w temperaturze pokojowej, ponieważ w podwyższonej temperaturze powodowały rozkład substratu. W obecności mocnych zasad heptaester **3** rozkłada się do polarnych produktów; prawdopodobnie zachodziła hydroliza estrów metylowych. Przyczyn niepowodzeń reakcji prowadzonych wobec katalizatorów palladowych upatrywałem głównie w strukturze substratu. Grupy estrowe stosunkowo łatwo mogą koordynować atom palladu i w ten sposób przerywać cykl katalityczny. Kolejnym ligandem, który mógł koordynować do atomu palladu, był anion cyjankowy. Czynniki te można wyeliminować pracując na akwakompleksach, pochodnych kwasu kobyrinowego. Jednak kilka podjętych prób wykazało, że nie zmienia to negatywnego wyniku reakcji, w której dominowały niezidentyfikowane produkty rozkładu.

Wykonane eksperymenty nie okazały się jednak zupełnie bezowocne. W wielu reakcjach zauważyłem powstawanie tych samych produktów rozkładu. Swoją uwagę skupiałem na związkach o rozszerzonym chromoforze, które sukcesywnie wydzielałem. W niektórych przypadkach pierwsze analizy związków okazały się na tyle ciekawe, że stały się podstawą do dalszych badań.

### 3.6. Dimer

Jedną z prób bezpośredniego arylowania przeprowadziłem w warunkach zaproponowanych przez Larrosę.<sup>194</sup> Reakcja sprzęgania indolu z jodobenzenem zachodziła efektywnie w obecności Pd(OAc)<sub>2</sub> i Ag<sub>2</sub>O, w temperaturze 25 °C. Dodatek kwasów nitrobenzoesowych zwiększał wydajność reakcji sprzęgania. Heptaester **3** poddałem reakcji z jodobenzenem w obecności Ag<sub>2</sub>O i kwasu *m*-nitrobenzoesowego, zaobserwowałem tworzenie się zielonego produktu (23%). Widmo spektrometrii mas nowopowstałego związku było bardzo złożone, jednak wnikliwa analiza pozwoliła mi przypisać pięć najbardziej intensywnych sygnałów. Dwa sygnały *m/z* = 2143 oraz 2192 odpowiadały jednododatnim jonom pseudomolekularnym [M–CN]<sup>+</sup> oraz [M+Na]<sup>+</sup>. Z wartości tych łatwo obliczyć, że monoizotopowa masa związku wynosi 2169 Da. Ponadto sygnałom *m/z* = 1058, 1083 oraz 1107 przypisałem dwudodatnie jony, odpowiednio: [M–2CN]<sup>2+</sup>, [M–CN+Na]<sup>2+</sup> oraz [M+2Na]<sup>2+</sup>. Na tej podstawie założyłem wstępnie, że w warunkach reakcji utworzył się dimer, powstały w wyniku połączenia dwóch jednostek substratu. W literaturze nie znalazłem informacji na temat dimerów pochodnych kwasu kobyrinowego. Znane są natomiast dimeryczne połączenia witaminy B<sub>12</sub>.<sup>195</sup>

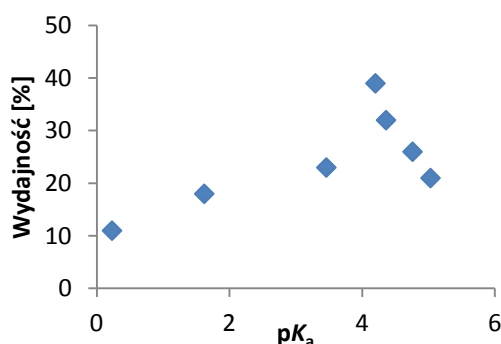
Często w widmach spektrometrii mas typowych pochodnych kwasu kobyrinowego obserwuje się sygnały odpowiadające klasterom, które tworzą się podczas pomiaru. Są to jony powstałe w wyniku niekowalencyjnego połączenia dwóch cząsteczek. Posiadają one masę około dwukrotnie większą od poszukiwanej masy związku. Mając na uwadze tę informację, ponownie wykonano analizy MS/ESI stosując wyższą energię jonizacji. Metoda ta często pozwala na wyeliminowanie sygnałów pochodzących od klasterów. Należy pamiętać, że zastosowanie zbyt dużej energii jonizacji prowadzi do rozerwania wiązań kowalencyjnych. Oszacowanie energii jonizacji potrzebnej do rozbicia klasterów, jednocześnie nie powodującej zrywania wiązań kowalencyjnych, zostało wyznaczone na podstawie pomiarów wykonanych dla substratu – heptaestru **3**. Podczas pomiarów stopniowo zwiększano energię jonizacji i obserwowano zmiany w widmach MS. Tworzenie się klasterów heptaestru **3** o  $m/z = 2151$  (odpowiadające jonowi  $[2M-CN]^+$ ) obserwowano przy zastosowaniu energii jonizacji niższej niż 20 eV. W zakresie energii jonizacji 20-40 eV, w widmie MS obserwowałem jedynie jon pseudomolekularny  $[M-CN]^+$  ( $m/z = 1062$ ). Stosując energię powyżej 40 eV zaobserwowałem stopniowo pogłębiającą się fragmentację, pierwszy jon fragmentacyjny posiadał  $m/z = 962$ . Natomiast w widmie spektrometrii mas dimeru, pierwsze zmiany zaobserwowałem już przy zastosowaniu energii jonizacji 40 eV. W widmie pojawiły się sygnały o  $m/z = 2092$ , świadczące o fragmentacji jonu pseudomolekularnego  $[M-CN]^+$ ,  $m/z = 2143$ . Wynik przeprowadzonych eksperymentów potwierdził prawidłowe przypisanie masy monoizotopowej badanemu związkowi (2169 Da).

Potwierdzenie wyników eksperymentów wykonanych metodą spektrometrii mas zweryfikowałem przy użyciu techniki NMR. Wyznaczenie współczynnika dyfuzji w eksperymencie NMR DOESY, który pozwala na oszacowanie masy molowej badanego związku. Współczynnik ten wyznaczony został dla heptaestru **3** i dimeru; na jego podstawie oszacowano masę molową substratu na około 950 Da oraz dimeru na 2400 Da. Wynik ten potwierdził informacje uzyskane techniką MS.

Niestety, otrzymany związek był nietrwały, rozkładał się na powietrzu i na żelu krzemionkowym, co obserwowałem na płytkach TLC jako zmianę koloru z zielonej na brunatną, dlatego też nie udało mi się uzyskać próbki o czystości odpowiedniej do wykonania analiz. Z zarejestrowanych widm NMR udało mi się wyciągnąć interesujące wnioski. Pierwsze, zarejestrowane w deuterowanym chloroformie widmo  $^1H$  NMR posiadało bardzo szerokie sygnały. Zmiana użytego do pomiaru rozpuszczalnika z  $CDCl_3$  na aceton- $d_6$  lub DMSO- $d_6$  wpłynęła pozytywnie na jakość widma. Jednak, największą poprawę ostrości sygnałów widma  $^1H$  NMR uzyskałem dzięki zastosowaniu podwyższonej, do 80 °C,

temperatury pomiaru. Niestety, taka temperatura pomiaru wykluczała, na dostępnych aparatach, rejestrowanie widm HMBC i HSQC ze względu na wymagany, długi czas akwizycji. Widmo  $^1\text{H}$  NMR otrzymanego związku było bardzo podobne do widma substratu. Zakładając dimeryczną strukturę związku spodziewałem się znacznie większej ilości sygnałów, trudno wyobrazić sobie, aby powstały związek posiadał elementy symetrii. W zakresie występowania sygnałów pochodzących od protonów grup estrowych  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$  obecnych było tylko siedem singletów, każdy o intensywności integralnej trzy. Interpretując widmo  $^1\text{H}$  NMR, w zakresie 5.9-6.5 ppm zaobserwowałem dwa singlety o intensywności integralnej 1H. Jeden z nich przypisałem jako sygnał protonu *mezo-*, który był mocno przesunięty w dół pola, w stosunku do substratu. Drugi z protonów posiadał sygnał korelacyjny w widmie HSQC, stąd wywnioskowałem, że był to proton związany z atomem węgla. W związku z niepowodzeniem w określeniu struktury za pomocą technik NMR,

Wykres 1. Zależność wydajności syntezy dimeru od  $\text{p}K_a$  użytego kwasu karboksylowego.



podjąłem próbę przygotowania monokryształu. Niestety, pomimo licznych prób, do tej pory, nie udało się otrzymać odpowiedniego monokryształu do wykonania rentgenowskiej analizy strukturalnej.

Jednocześnie do badań nad ustalaniem struktury dimeru, przeprowadziłem optymalizację syntezy. Pierwsze eksperymenty wykazały, że reakcja bez  $\text{Ag}_2\text{O}$

prowadzi do powstania jedynie śladowych ilości produktu. Wydajność reakcji uległa poprawie w obecności kwasu karboksylowego (1 ekwiw.). Ponadto okazało się, że zależy ona od  $\text{p}K_a$  użytego kwasu (Wykres 1). Najlepsze wyniki uzyskałem dla reakcji prowadzonej w obecności kwasu benzoowego –  $\text{p}K_a = 4.20$  (39%). Stężenie substratu miało niewielki wpływ na wydajność reakcji, najlepsze wyniki uzyskałem stosując 0.02 M roztwór heptaestru **3**. Zastosowanie innego rozpuszczalnika niż DMF, powodowało obniżenie wydajności i często wiązało się z koniecznością wydłużenia czasu reakcji (Tabela 16). Zmiana proporcji zastosowanych reagentów nie przyniosła poprawy wydajności.

Tabela 16. Synteza dimeru w różnych rozpuszczalnikach.

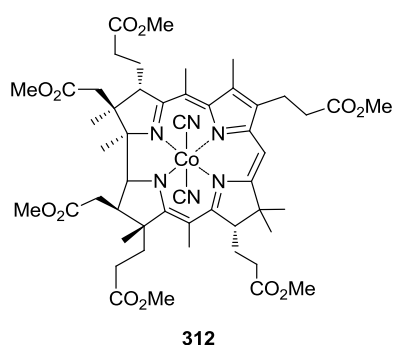
Lp.	Czas [godz.]	Wydajność dimeru [%]	Rozpuszczalnik
1	20	39	DMF
2	20	19	NMP
3	40	17	Toluen
4	92	8	1,4-dioksan
5	40	5	t-BuOH
6	20	5	DCE

Warunki reakcji: Heptaester **3** 14  $\mu\text{mol}$ ,  $\text{Ag}_2\text{O}$  1 ekwiw., kwas benzoesowy 1 ekwiw., stężenie 0.02 M, temperatura 80 °C

Podsumowując, otrzymałem związek, którego dokładnej struktury, jak dotąd nie udało mi się określić. Wiadomo jednak, że jest to związek o strukturze dimeru.

### 3.7. Kobryketon

Jednym z często powstających produktów ubocznych, obserwowanych podczas prób bezpośredniego arylowania heptaestru **3**, prowadzonych w obecności katalizatorów palladowych był związek o niebieskiej barwie i polarności bardzo zbliżonej do substratu.

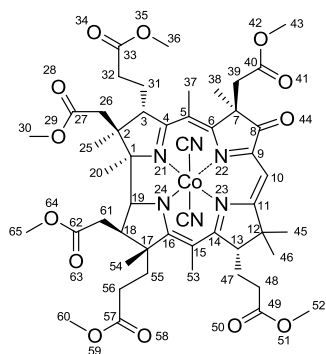


Rysunek 24. Pirokobester **312** otrzymany przez Inhoffena.

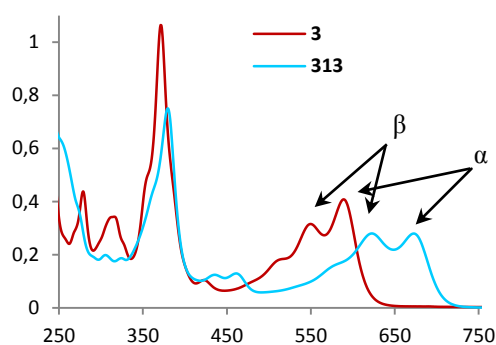
W literaturze opisano kilka interesujących przykładów pochodnych witaminy B<sub>12</sub> o rozszerzonym chromoforze, zwykle są one nietrwałe lub otrzymywane z bardzo niską wydajnością. Analiza MS/ESI nowego związku wykazała, że posiada on masę monoizotopową 1016 Da, mniejszą o 72 Da od masy monoizotopowej substratu. Informacja ta sugerowała eliminację łańcucha węglowego, jest to sytuacja bardzo rzadka w przypadku pochodnych witaminy B<sub>12</sub>. Inhoffen opisał pochodną witaminy B<sub>12</sub>, pozbawioną łańcucha węglowego w pozycji *c*- (Rysunek 24).<sup>196</sup> Pirokobester **312** otrzymano w wyniku termicznej pirolizy heptaestru metylowego **3** we wrzącej dekalinie z niską wydajnością (34%). Związek ten posiadał dodatkowe wiązanie podwójne pomiędzy węglami C7 i C8.

#### 3.7.1. Ustalenie struktury kobryketonu

Strukturę nowego związku ustaliłem na podstawie widm NMR (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C oraz korelacyjnych). Nowa pochodna **313** została nazwana kobryketonem (Rysunek 25).



Rysunek 25. Numeracja atomów kobryketonu **313**.



Rysunek 26. Nałożone widma UV/Vis kobryketonu **313** oraz estru **3** przy stężeniu  $3.5 \times 10^{-5}$  M.

W widmie spektrometrii mas obserwowałem jedynie sygnały pochodzące od jonów pseudomolekularnych  $[M-CN]^+$  (990.39) oraz  $[M+Na]^+$  (1039.39), co jest typowe dla hydrofobowych pochodnych kwasu kobrynowego. Zatem masa molowa związku **313** (1016 Da) jest o 72 Da mniejsza od masy heptaestru **3**. Takiej utracie masy odpowiadało oderwanie od struktury substratu fragmentu propionianu metylu z jednoczesnym przyłączeniem atomu tlenu.

W widmie UV/Vis pasma  $\alpha$  oraz  $\beta$  uległy znacznemu przesunięciu batochromowemu, w wyniku rozszerzenia chromoforu pierścienia koryny (Rysunek 26). W pozycji C8 znajduje się grupa karbonylowa sprzężona z wiązaniami podwójnymi obecnymi w pierścieniu. Ponadto zaobserwowałem obniżenie intensywności wszystkich pasm.

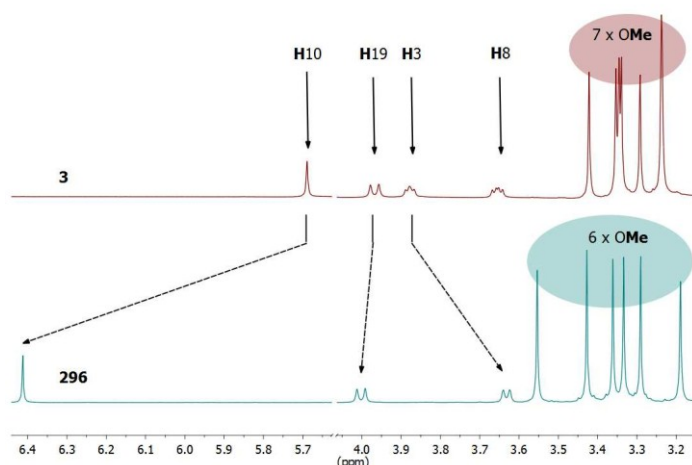
W widmie  $^1H$  NMR singlet przy 6.41 ppm przypisałem protonowi w pozycji *mezo*- (Rysunek

27). Sygnał ten przesunięty jest o  $\Delta\delta = 0.7$  ppm w stronę niższego pola w stosunku do sygnału zarejestrowanego dla substratu. W zakresie występowania sygnałów pochodzących od estrów metylowych ( $-CO_2CH_3$ ) występuje sześć dobrze wyizolowanych singletów o intensywności integralnej równej trzy każdy. Potwierdza to założenie, że w strukturze związku obecne jest

tylko sześć grup estrowych.

W widmie  $^{13}C$  NMR jeden z sygnałów jest silnie przesunięty w dół pola (200.8 ppm). Analogiczne przesunięcie obserwuje się dla sygnałów węgla karbonylowych w sprzężonych z pierścieniem aromatycznym

ketonach. Położenie węgla karbonylowego C8 potwierdzają sygnały korelacyjne obecne



Rysunek 27. Nałożenie widm  $^1H$  NMR heptaestru **3** oraz kobryketonu **313** (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

Tabela 17. Tabela zaobserwowanych sprzężeń w widmach dwuwymiarowych kobryketonu **313**.

Przypisanie	<sup>13</sup> C NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje		Przypisanie	<sup>13</sup> C NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje	
		HSQC	HMBC			HSQC	HMBC
C08	200.8		C10, C39, C38	C36	51.33	3.43	
C11	178.6		C10, C13	C30	51.27	3.19	
C16	176.2		C19, C13, C55*, C53	C52	51.0	3.29	
C04	174.0		C3, C37	C07	50.4		C39, C37, C38
C49	173.6		C52, C48, C47	C12	47.6		C10, C13, C47
C57	172.7		C60, C56, C55*	C02	46.7		C19, C3, C26, C31, C20, C25
C33	172.2		C36, C32, C31	C39	42.2	3.10 oraz 2.75	C38
C27	171.9		C30, C26	C26	41.1	2.86 oraz 2.22	C3, C25
C62	171.7		C65, C61	C18	39.8	2.88	C19, C55, C61, C20
C40	168.8		C43, C39	C32	34.3	2.54 oraz 2.46	C3, C31
C14	163.7		C19, C13, C47, C53	C55	33.4	2.40 oraz 1.80	C18, C56
C06	157.2		C39*, C37, C38	C61	31.7	2.28 oraz 2.17	C19, C18
C09	152.3		C10	C48	30.7	2.57 oraz 2.62	C13, C47
C15	105.9		C19, C13, C53	C45 lub C46	30.03 lub 29.99	0.89	C13, C45, C47*
C05	105.6		C3, C37	C56	30.03 lub 29.99	2.72 oraz 2.38	C54, C55
C10	87.6	6.41		C47	25.9	2.01 oraz 1.74	C13, C48
C01	83.4		C19, C3, C18, C26, C20, C25	C31	24.9	2.05 oraz 1.85	C3, C32
C19	76.0	4.00	C18, C61*, C20	C20	23.0	1.45	C19
C17	58.7		C18, C55, C61	C38	21.5	0.94	C38, C39
C03	57.6	3.63	C32, C26, C31, C25	C45 lub C46	19.3	0.92	C13
C13	54.2	2.82	C48, C47	C54	18.6	0.92	C18, C55
C43	53.2	3.55		C25	16.6	1.15	C26
C65	51.7	3.33		C53	16.0	2.21	
C60	51.4	3.36		C37	14.0	2.03	

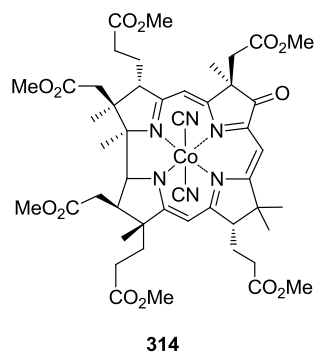
\*Zaobserwowano sprzężenie tylko z jednym z diastereotopowych protonów.

w dwuwymiarowych widmach NMR. W widmie HMBC proton w pozycji *mezo*- koreluje z czterema sygnałami węglowymi 47.6 ppm (C12), 152.3 ppm (C9), 178.6 ppm (C11) oraz 200.8 ppm (C8). Obecność wśród nich sygnału pochodzącego od węgla karbonylowego pozwala przypuszczać, że położony jest on w odległości nie większej niż dwa wiązania od węgla C10. Skoro wcześniej stwierdziłem, w widmie protonowym, brak sygnału pochodzącego od jednej z grup estrowych, zatem węgiel C8 musi być węglem karbonylowym.

Jednak, aby mieć pewność prawidłowego rozwiązania struktury pozostałe sygnały zostały przypisane, a zaobserwowane sygnały korelacyjne zestawiono w tabeli (Tabela 17).

### 3.7.2. Otrzymywanie kobryketonu – optymalizacja syntezy

Kobryketon **313** jest przykładem bardzo nielicznych pochodnych kwasu kobrynowego, w których jedna pozycja uległa selektywnemu wyeliminowaniu. Jest to bardzo cenny związek, ponieważ może być prekursorem innych *d*-nor pochodnych. Te z kolei po przebadaniu zdolności do regulacji sGC mogłyby pomóc wyjaśnić jaki wpływ na aktywację enzymu ma brak grupy w pozycji *d*-. W przypadku dramatycznego spadku aktywności, będę mógł stwierdzić, że obecność łańcucha *d*- jest kluczowa i odwrotnie, jeżeli zaobserwowany zostanie wzrost aktywności może to oznaczać, że obecność w strukturze łańcucha *d*- powoduje inhibowanie aktywacji enzymu przez korynę. Z tej przyczyny postanowiłem zoptymalizować syntezę kobryketonu **313** i użyć go jako związku wyjściowego do syntezy kolejnych *d*-nor pochodnych kwasu kobrynowego.

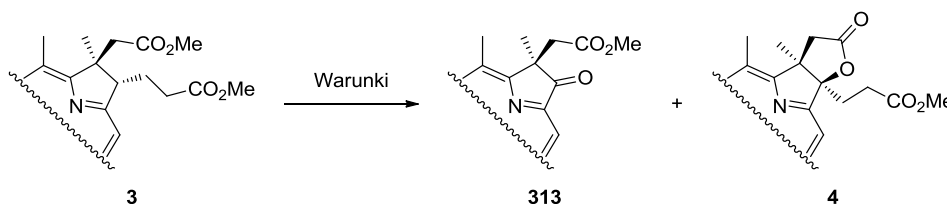


314

Rysunek 28. Związek otrzymany przez Maaga.

W literaturze znajduje się jeden przykład podobnego związku **313**, opisany przez Maaga w swojej pracy doktorskiej (Rysunek 28).<sup>197</sup> Został on otrzymany z bardzo niską wydajnością (7%) jako produkt uboczny w reakcji pochodnej kobinamidu z  $\text{KMnO}_4$  w bezwodnej pirydynie. Próba wykorzystania tych warunków zakończyła się niepowodzeniem.  $\text{KMnO}_4$  utlenia heptaester **3** dając liczne polarne produkty, których nie analizowałem.

Na początku ustaliłem cechy wspólne reakcji, w których obserwowałem powstawanie kobryketonu. Były nimi, obecność katalizatora palladowego i ligandów fosfinowych. W każdej reakcji obserwowałem powstawanie *c*-laktonu **4** jako produktu ubocznego. Optymalizację otrzymywania kobryketonu **313** rozpocząłem od zastosowania  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  w roli katalizatora. Jest to sól często używana w próbach reakcji bezpośredniego arylowania (Schemat 66, Tabela 18).



Schemat 66. Otrzymywanie kobryketonu **313**.

W obecności katalitycznych ilości octanu palladu(II) ester metylowy kwasu kobrynowego **3**, w bezwodnych i beztlenowych warunkach, pozostawał niezmienny, tworzyła się jedynie niewielką ilość polarnych produktów (Tabela 18, wiersz 1). Powtórzenie tej reakcji z dodatkiem wody (1 ekwiw.) nie prowadziło do powstawania kobryketonu **313** (wiersz 2). Natomiast, w analogicznej reakcji prowadzonej w rozpuszczalniku nasyconym tlenem, kobryketon **313** tworzył się z wydajnością 14% (wiersz 3). Stało się więc jasne, że obecność tlenu jest czynnikiem kluczowym i kolejne reakcje prowadziłem w rozpuszczalniku nasyconym tlenem. Dodatek trifenylofosfiny spowodował zwiększenie wydajności do 24%, przy czym konwersja substratu była całkowita (wiersz 4). W reakcji jako produkt uboczny tworzył się *c*-lakton **4**. Niewielki dodatek wody poprawił wydajność syntezy kobryketonu do 32% (wiersz 5). Dalsze próby zwiększenia wydajności nie powiodły się (wiersze 6-11). Jako warunki optymalne przyjąłem: Pd(OAc)<sub>2</sub>/PPh<sub>3</sub> (0.2/0.4 ekwiw.), H<sub>2</sub>O (1 ekwiw.), DMF nasycony O<sub>2</sub>, czas reakcji – 4.5 godziny, 80 °C.

Tabela 18. Optymalizacja otrzymywania kobryketonu.

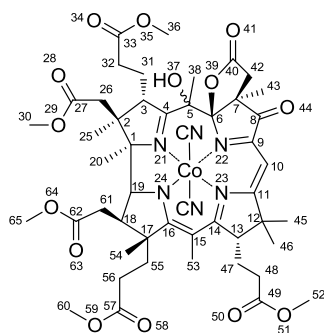
Lp.	Utleniacz	Fosfina	Dodatek	Czas [godz.]	Kobryketon <b>313</b> [%]
1 <sup>(a)</sup>	–	–	–	24	n. w.
2 <sup>(b)</sup>	–	–	H <sub>2</sub> O	4.5	n. w.
3	O <sub>2</sub>	–	–	3	14
4	O <sub>2</sub>	PPh <sub>3</sub>	–	3	24
5 <sup>(b)</sup>	O <sub>2</sub>	PPh <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	4.5	32
6	O <sub>2</sub>	PPh <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	4.5	26
7	O <sub>2</sub>	DavePhos <sup>®</sup>	H <sub>2</sub> O	4.5	22
8	O <sub>2</sub>	<i>t</i> -Bu <sub>3</sub> P	H <sub>2</sub> O	4.5	19
9	O <sub>2</sub>	Cy <sub>3</sub> P	H <sub>2</sub> O	4.5	Ślady
10	O <sub>2</sub>	PPh <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O, KOAc	4.5	21
11	O <sub>2</sub>	PPh <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O, CsOAc	4.5	10

Warunki reakcji: heptaester **3** (14 μmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (20% mol), fosfina (40% mol), dodatek (2 ekwiw.), DMF nasycony O<sub>2</sub>, stężenie 0.07 M, 80 °C. (a) Odgazowany rozpuszczalnik, reakcja w atmosferze argonu. (b) Dodatek (1 ekwiw.). n. w. – nie wykryto.

Wiadomo, że rozpuszczalność tlenu w DMF jest niska,<sup>198,199</sup> dlatego spodziewałem się, że zmiana rozpuszczalnika może mieć istotny wpływ na przebieg reakcji. Jednak próby reakcji w rozpuszczalnikach, w których tlen rozpuszcza się dobrze (np. acetonitryl, toluen, THF) zawiodły (Tabela 19). Tylko w DMSO obserwowałem podobny przebieg reakcji, mimo że rozpuszczalność tlenu w tym rozpuszczalniku jest w przybliżeniu o połowę mniejsza (wiersz 1). Wynika z tego, że rozpuszczalność tlenu nie jest czynnikiem determinującym.





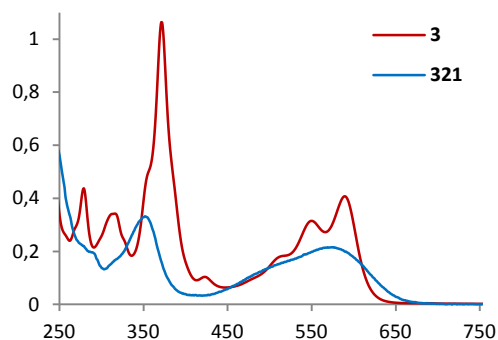


Rysunek 29. Numeracja atomów ksantokobryketonu **321**.

W reakcji prowadzonej w przepływie tlenu zaobserwowałem, że pożądany kobryketon **313** tworzył się z nieco niższą wydajnością (24%). Wiązało się to z powstawaniem niepolarnego produktu ubocznego o fioletowej barwie (6%). Śladowe ilości tego produktu obserwowałem również w niektórych reakcjach, na etapie optymalizacji. Analiza tego związku techniką spektrometrii mas wykazała, że  $m/z = 1018$ , czyli masę mniejszą od substratu o 71 Da. Produktem ubocznym tworzącym się podczas syntezy kobryketonu **313** w zwiększonej skali okazał się ksantokobryketon **321** (Rysunek 29).

W widmie spektrometrii mas związku **321** zaobserwowałem zestaw trzech sygnałów o  $m/z = 992.7$ , 1018.6 oraz 1041.5. Sygnały te przypisałem kolejno jonom  $[M-CN]^+$ ,  $[M]^+$  oraz  $[M+Na]^+$ . W widmie  $^1H$  NMR w zakresie 5.3-5.8 zaobserwowałem dwa singlety (5.71, 5.39 ppm) o intensywności integralnej jeden każdy. W tym zakresie zazwyczaj obserwuje się pojedynczy sygnał pochodzący od protonu *mezo*-. Sygnał przy 5.39 ppm nie koreluje z żadnym sygnałem w widmie HSQC, zatem nie jest to proton połączony bezpośrednio z atomem węgla. Sugerowało to obecność grupy hydroksylowej. W zakresie występowania sygnałów pochodzących od estrów metylowych zaobserwowałem jedynie pięć singletów przypisanych jako  $-CO_2CH_3$ . Strukturę związku **321** ustaliłem przypisując sygnały korelacyjne w dwuwymiarowych widmach NMR (COSY, HSQC i HMBC). Analizę przeprowadziłem analogicznie do poprzednio wykonywanych, co pozwoliło mi przypisać wszystkie sygnały. Odpowiednie zestawienie znajduje się w tabeli w części eksperymentalnej (Tabela 21).

Analogiczne związki były otrzymywane przez Chemaly'ego w reakcji heptaestru **3** z kwasem askorbinowym i co ciekawe posiadały barwę żółtą.<sup>200</sup> Taka barwa wiąże się



Rysunek 30. Nałożone widma UV/Vis estru **3** oraz ksantokobryketonu **321**. Stężenie  $3.5 \times 10^{-5}$  M.

z przerwaniem sprzężenia wiązań podwójnych tworzących chromofor. Otrzymany przeze mnie związek posiadał barwę fioletową, ponieważ z jednej strony doszło do zmniejszenia ilości wiązań podwójnych wchodzących w skład chromoforu, a z drugiej strony chromofor uległ rozszerzeniu przez sprzężenie z grupą karbonylową. Taka zmiana strukturalna

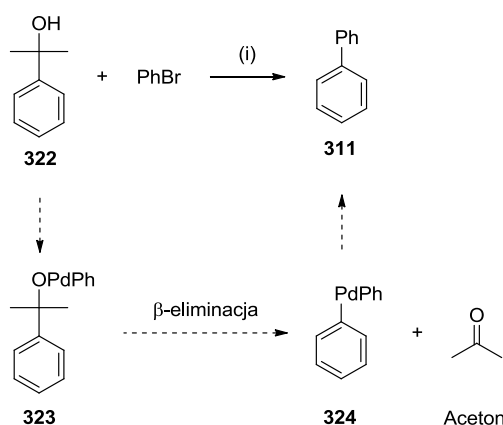
zaznaczyła wyraźnie swój wpływ w widmie absorpcyjnym UV/Vis, które w porównaniu do substratu utraciło swoją subtelną strukturę (Rysunek 30). Zarejestrowane pasma są wyraźnie poszerzone, a ich współczynniki ekstynkcji zmalały. Jest to zgodne z analogicznymi obserwacjami Chemaly'ego.<sup>200</sup>

### 3.7.3. Mechanizm reakcji syntezy kobryketonu

W toku badań postanowiłem spróbować wyjaśnić mechanizm tworzenia się kobryketonu **313**. Produktem ubocznym w tej reakcji jest *c*-lakton **4**, który tworzył się w każdej reakcji. Związek ten, w warunkach reakcji, nie ulegał przemianie w kobryketon **313**, a więc musiał tworzyć się równoległe z produktem **313**.

Znanych jest niewiele przykładów katalitycznego rozerwania wiązania C–C. Najczęściej, są to reakcje otwierania naprężonych pierścieni cyklopropanowych<sup>201</sup> lub

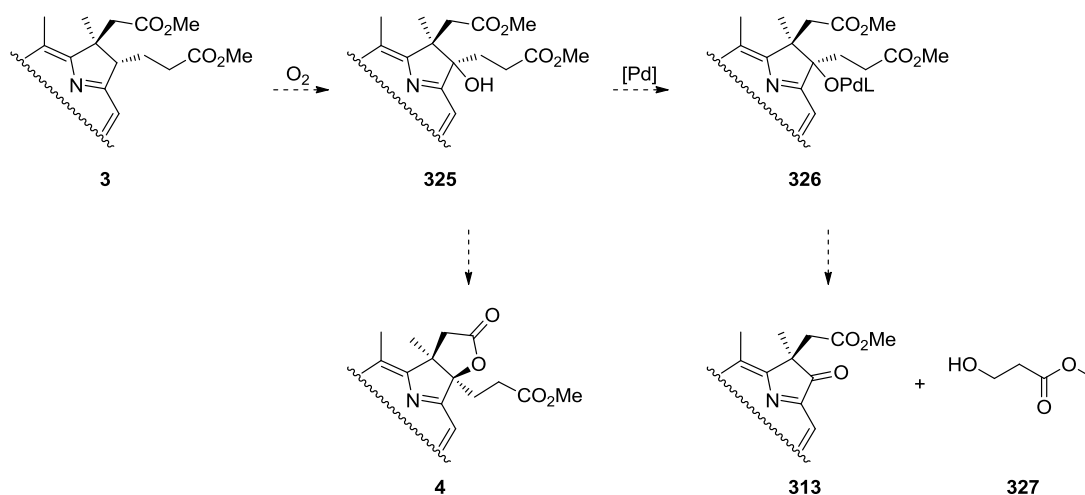
cyklobutanowych.<sup>202</sup> Natomiast do bardziej znanych przykładów katalitycznego rozrywania niepierścieniowego wiązania C–C należą reakcje alkoholi trzeciorzędowych, które wykorzystywano jako substrat w bezpośrednim arylowaniu.<sup>203</sup> Przykładowo, Miura opisał reakcję, w której 2-fenylpropan-2-ol (**322**) reagował z bromobenzenem w obecności Pd(OAc)<sub>2</sub>/PPh<sub>3</sub>/Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dając bifenył (**311**) i aceton jako produkt uboczny (Schemat 68).<sup>204,205</sup> Kluczowym etapem w tej reakcji jest



Schemat 68. Bezpośrednie arylowanie opisane przez Miurę. (i) Pd(OAc)<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, o-ksylen, wrzenie, 15 godz.

$\beta$ -eliminacja, podczas której następuje rozerwanie wiązania C–C związku pośredniego **323** i utworzenie ketonu.

W literaturze dotyczącej pochodnych witaminy B<sub>12</sub>, jak również w naszym zespole zaobserwowano tworzenie się związków z grupą hydroksylową w pozycji C8.<sup>145</sup> Założyłem więc, że powstanie takiego alkoholu może być pierwszym etapem w reakcji prowadzącej do powstawania kobryketonu **313** (Schemat 69). Następnie, alkohol **325** mógłby reagować, w sposób analogiczny do przedstawionego przez Miurę alkoholu **322**, dając kobryketon **313** lub cyklizować do *c*-laktonu **4**.



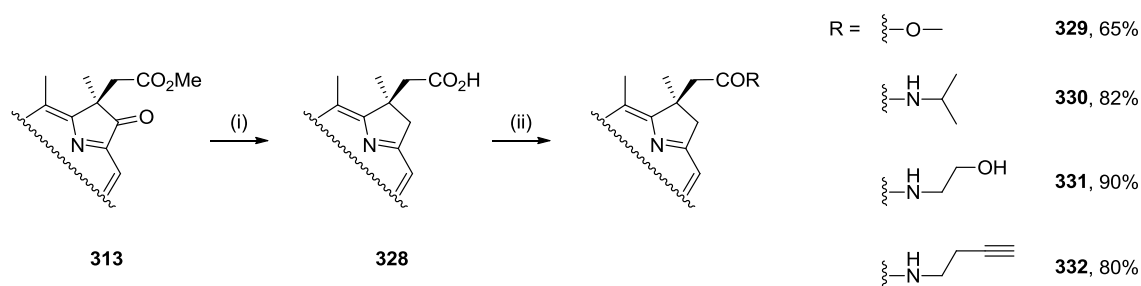
Schemat 69. Propozycja etapów reakcji tworzenia kobryketonu.

W trakcie reakcji prowadzącej do powstania kobryketonu **313**, przebiegającej z rozerwaniem wiązania C–C, tworzy się pochodna propionianu metylu **327**. W celu wykrycia tego typu związków postanowiłem przeprowadzić analizę GC/MS surowej mieszaniny reakcyjnej. W otrzymanym chromatogramie znalazłem sygnał, w którego widmie masowym sygnał jonu molekularnego posiadał  $m/z = 103$  Da. Widmo fragmentacyjne tego związku potwierdziło strukturę 3-hydroksypropionianu metylu **327**. Ostatecznie, dodatek standardu wewnętrznego do próbki mieszaniny reakcyjnej jednoznacznie potwierdził obecność 3-hydroksypropionianu metylu **327**.

Otrzymałem pierwszy stabilny związek **313** z wyeliminowaną selektywnie pozycją *d*-. Opracowałem metodę otrzymywania tego związku, jak również wykonałem eksperymenty, które przybliżyły do ustalenia mechanizmu jego powstawania.

### 3.7.4. Modyfikacje w pozycji *c*-

W toku dalszych badań za cel obrałem otrzymanie analogu heptaestru **3** pozbawionego podstawnika w pozycji *d*-. W tym celu kobryketon **313** poddałem redukcji borowodorkiem sodu w metanolu. W wyniku reakcji otrzymałem skomplikowaną mieszaninę produktów. Często stosowanym układem redukcyjnym w przypadku pochodnych kwasu kobrynowego jest świeżo aktywowany pył cynkowy w 20% roztworze kwasu octowego w toluenie.<sup>155</sup> W tych warunkach reakcja przebiegła bardzo szybko i selektywnie. Nieoczekiwanie, produktem tej reakcji okazał się *d*-nor-*c*-kwas **328** (Schemat 70). Prawdopodobnie w warunkach reakcji powstający alkohol cyklizuje do odpowiedniego laktonu, który natychmiast ulega redukcji do kwasu **328**.



Schemat 70. Synteza *d*-*nor*-*c*-zmodyfikowanych pochodnych kwasu kobrynowego. (i) Zn, AcOH/toluen, 30 min, 81%; (ii) sprzężanie amin: DEPC, DIPEA, DMF, 16 godz.; sprzężania z metanolem: EDC·HCl, DMAP, DCM, 16 godz.

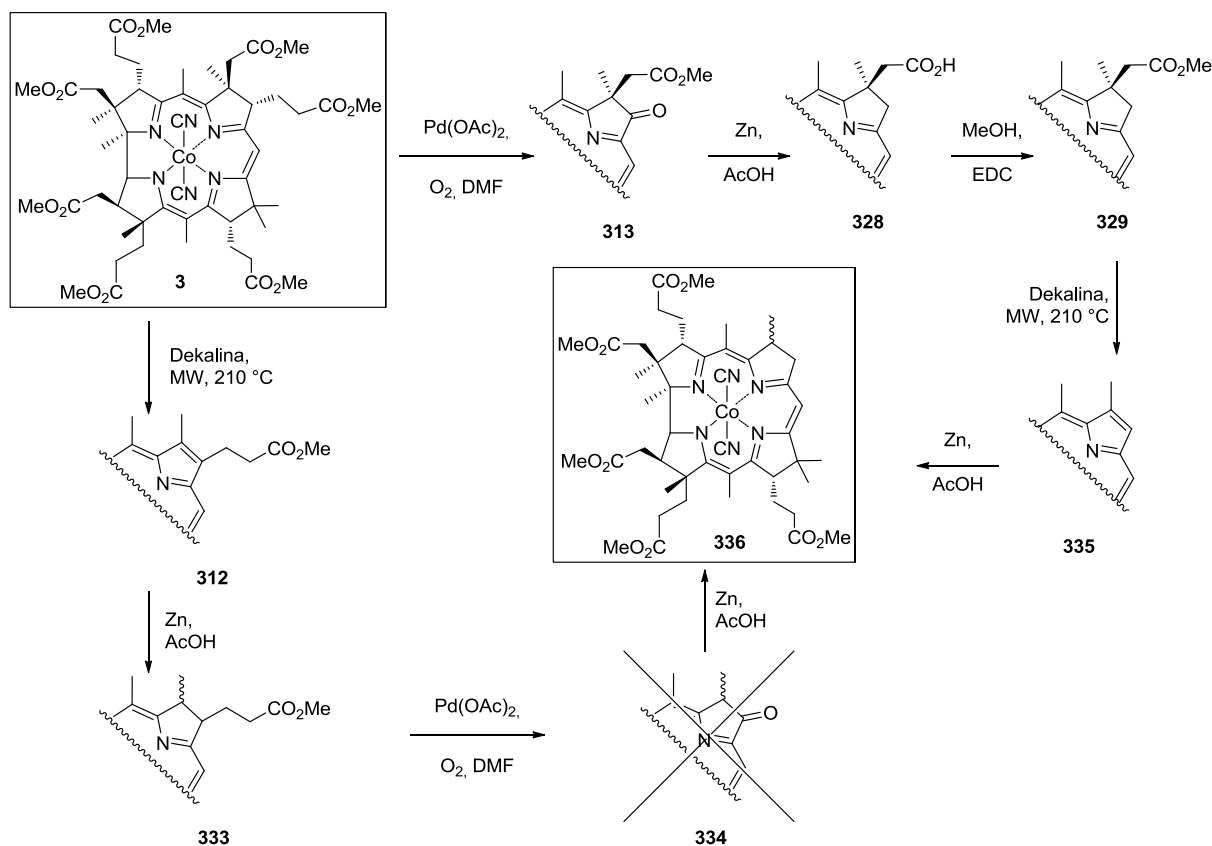
Wychodząc z heptaestru **3** w dwóch etapach otrzymałem kwas **32**, związek łatwy do funkcjonalizacji. *c*-Kwas **328** przeprowadziłem w reakcji sprzężenia z aminami pierwszorzędowymi przy użyciu DEPC w zmodyfikowane w pozycji *c*-analogi. W reakcjach tych, pożądane amidy **330-332** tworzyły się z bardzo dobrymi wydajnościami 80-90%. Sprzężając *c*-kwas **328** z metanolem przy użyciu EDC·HCl otrzymałem heksaester **329**.

Otrzymane przeze mnie związki **330-332** są pierwszymi stabilnymi *nor-d*-pochodnymi kwasu kobrynowego. Opisane powyżej analogi zostały przekazane do laboratorium Emila Martina w celu przebadania ich właściwości biologicznych. Mam nadzieję, że pozwolą one na określenie sposobu łączenia się pochodnych kwasu kobrynowego z miejscem aktywnym enzymu. Porównując dane, dotyczące zdolności aktywowania sGC dla pochodnych nieposiadających łańcucha *d*-z analogami posiadającymi ten element struktury, możliwe będzie określenie wpływu tego elementu dla samego procesu łączenia się w miejscu aktywnym enzymu.

### 3.7.5. Pentaester

Jedyną dotychczas znaną *nor*-pochodną kwasu kobrynowego był pirokobester **312**, opisany przez Inhoffena w 1981 roku (Rysunek 24).<sup>196</sup> Związek ten otrzymano na drodze termicznej pirolizy heptaestru **3** w dekalinie (34%). W przeciwieństwie do kobryketonu **313**, pirokobester **312** jest związkiem nietrwałym i ulega degradacji pod wpływem światła i tlenu. Związek ten, po uwodornieniu daje *nor-c*-analog heptaestru **3**.<sup>206</sup> Na podstawie powyższych informacji zaplanowałem syntezę analogu estru **3**, pozbawionego podstawników alkiloestrowych w pozycjach *c*- i *d*- – pentaestru **336**. Teoretycznie, dwie drogi syntetyczne prowadzą do otrzymania tego związku: 1) piroliza, a następnie usunięcie grupy propionianu metylu w pozycji *d*- na drodze katalitycznego rozerwania wiązania C–C lub 2) otrzymanie heksaestru **329**, a następnie piroliza i uwodornienie (Schemat 71). Wydawało się, że korzystniejsze będzie przeprowadzenie pirolizy w pierwszym etapie, ponieważ otrzymany

z pirokobestru **312**, w reakcji redukcji, *c*-nor-heksaester **333** nie mógłby ulegać niepożądanym reakcji tworzenia *c*-laktonu. Ponadto ta droga syntezy byłaby krótsza.



Schemat 71. Założone ścieżki syntetyczne mogące prowadzić do pentaestru **336**.

Obecnie reakcje w wysokich temperaturach często prowadzi się w reaktorach mikrofalowych.<sup>207-209</sup> Wygoda użycia takiego reaktora skłoniła mnie do opracowania metody pirolizy estru **3** w nowych warunkach. Prowadząc reakcję w reaktorze mikrofalowym w ciągu 5 minut w temperaturze 210 °C otrzymałem pożądany związek **312** z wydajnością 55%. Pirokobester **312** poddałem redukcji w warunkach opisanych przez Kräutlera (Zn/AcOH).<sup>206</sup> Powstałą mieszaninę stereoisomerów próbowałem przekształcić w kobryketon. Okazało się, że w warunkach reakcji substrat bardzo szybko rozkładał się. Z tego powodu zarzuciłem tę ścieżkę syntetyczną.

Druga droga syntetyczna dała lepsze rezultaty. Heksaester **329** poddałem pirolizie w opracowanych przeze mnie warunkach. Piroliza prowadzona w reaktorze mikrofalowym w temperaturze 210 °C dała pożądany produkt **335** z wydajnością 38%. Redukcja pochodnej **335** pyłem cynkowym w kwasie octowym do pentaestru **336** przebiegła jednak z bardzo niską wydajnością (25%). Pochodna **335**, podobnie jak pirokobester **312**, jest związkiem bardzo wrażliwym na światło i tlen, dlatego postanowiłem mieszaninę reakcyjną poddać redukcji

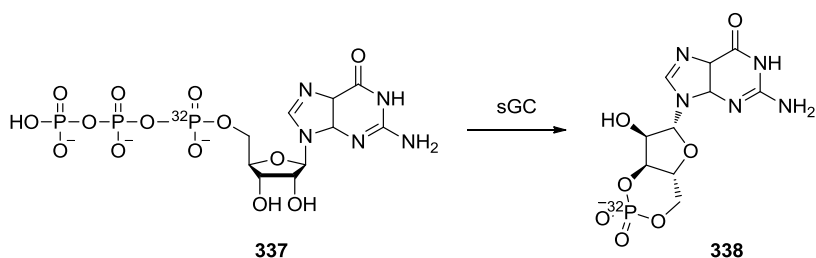
bezpośrednio po pirolizie. Takie postępowanie przyniosło zadowalające rezultaty i pozwoliło mi wydzielić pentaester **336** w postaci mieszaniny stereoizomerów z całkowitą wydajnością dwóch etapów 35%.

Otrzymane związki zostały przesłane w celu przebadania zdolności aktywacji sGC do laboratorium Emila Martina w Houston.

### 3.8. Badania biologiczne otrzymanych związków

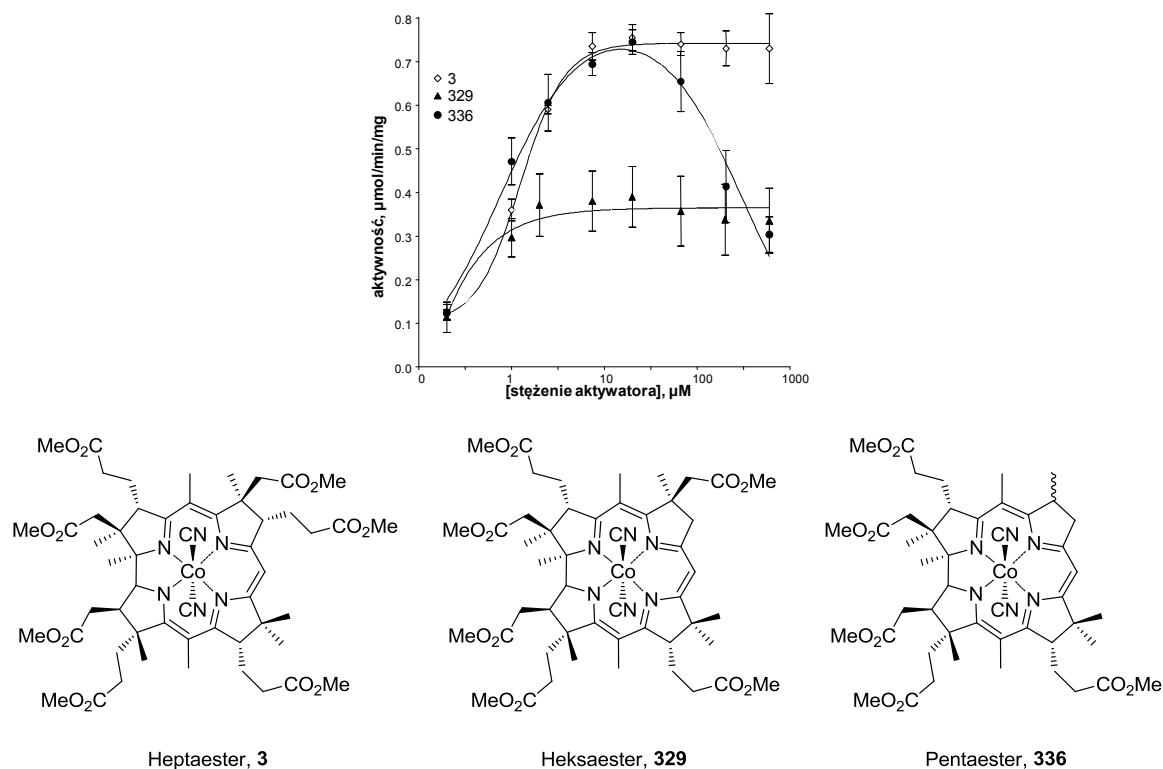
Część otrzymanych związków została przekazana do University of Texas Health Science Center w Houston gdzie została przebadana ich zdolność aktywowania sGC.

W celu zbadania aktywności biologicznej związku używa się oczyszczony enzym oraz znakowany radioizotopem  $^{32}\text{P}$  guanozyno-5'-trifosforan ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$  – **337**). Do inkubowanego w temperaturze  $37\text{ }^\circ\text{C}$  enzymu dodaje się badany związek, a następnie  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ . Po odpowiednim czasie reakcja tworzenia cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP – **338**) zostaje przerwana poprzez dodanie octanu cynku (Schemat 72). Następnie technikami chromatograficznymi wydziela się powstający cGMP. Ilość  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$  oznacza się za pomocą spektrometru scyntylicyjnego mierząc emisję promieniowania Czerniakowa/Czerenkowa. Otrzymane wyniki standaryzowane są do ilości cGMP powstającego w kontrolnej reakcji enzymatycznej prowadzonej bez dodatku regulatora.



Schemat 72. Katalizowana sGC reakcja  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$  do  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ .

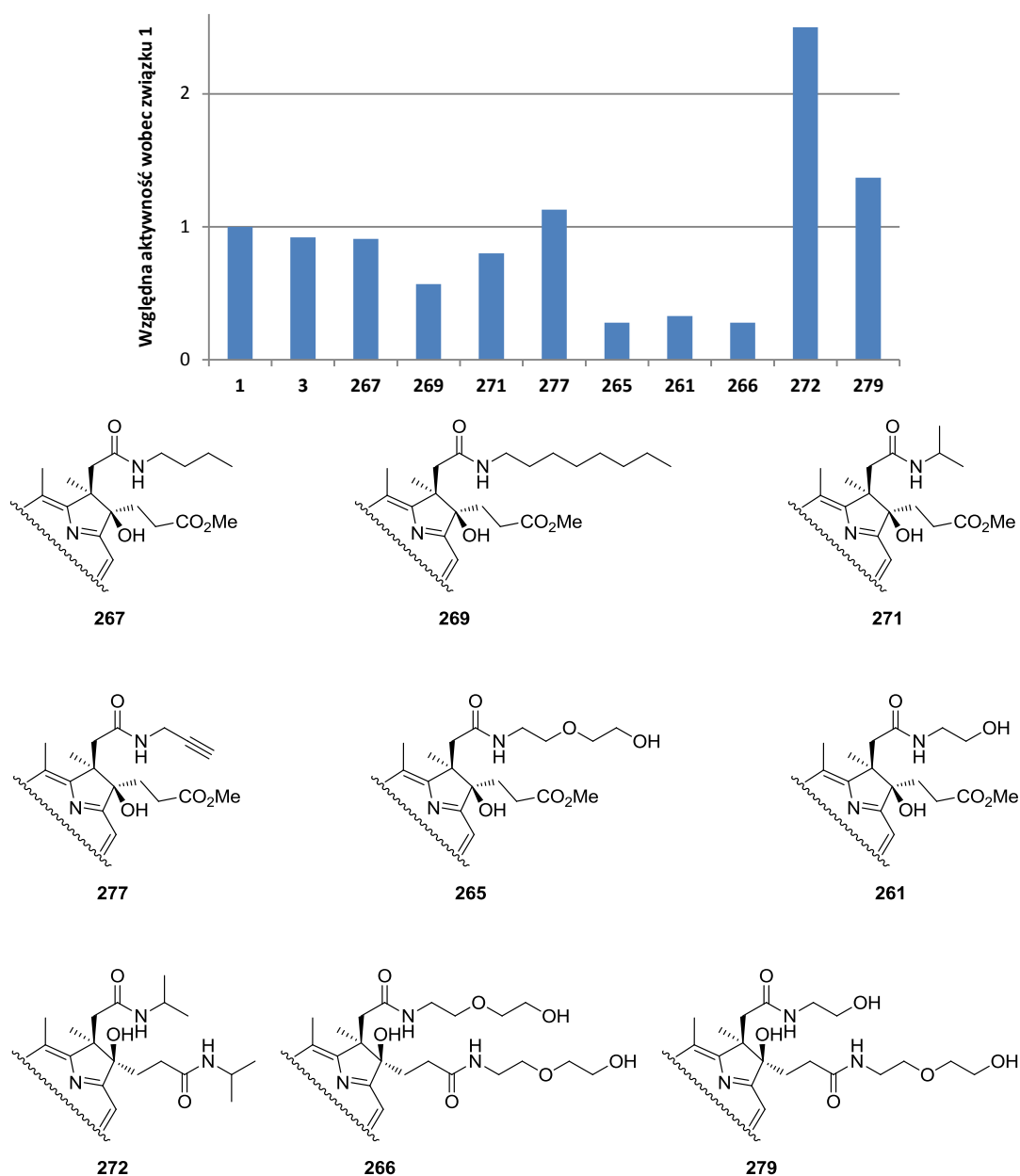
Porównując wyniki zdolności aktywowania sGC przez ester **3** oraz heksaester **329** można zauważyć, że usunięcie estru z pozycji *d*- powoduje osłabienie aktywacji sGC (Wykres 2). Taki sam kształt krzywej aktywności dla heksaestru i heptaestru sugeruje podobny mechanizm działania obu związków. W przypadku pentaestru **336**, w małych stężeniach zdolność do aktywowania sGC jest porównywalna do heptaestru **3**, jednak ze wzrostem stężenia wzrasta efekt hamujący aktywację.

Wykres 2. Porównanie aktywności związków **3**, **329** oraz **336**.

Jednym z przykładów naturalnie występujących pochodnych witaminy B<sub>12</sub> o udowodnionej aktywności względem sGC jest kobinamid **1**. Aktywność poszczególnych związków odniesiono do kobinamidu. Najprostsza hydrofobowa pochodna – heptaester **3** – wykazuje podobną zdolność do aktywacji sGC (Wykres 3, **3**). Monoamidy posiadające podstawniki alkilowe w pozycji *c*- mają porównywalną zdolność do aktywacji (**267**, **271** oraz **277**), przy czym zbyt duży podstawnik (*n*-oktylowy) powoduje jej wyraźny spadek (**269**). Najślabszymi aktywatorami spośród przebadanych pochodnych monoaminowych były związki posiadające w pozycji *c*- podstawnik etanoloamidowy lub etoksyetanoloamidowy (**265**, **261** oraz **266**). Wyjątek stanowi diamid posiadający podstawniki etanoloamidowy oraz etoksyetanoloamidowy odpowiednio w pozycjach *c*- oraz *d*- (**279**). Aktywność tej pochodnej była znacząco większa od aktywności kobinamidu **1**. Najlepszym aktywatorem był diamid posiadający podstawniki izopropiloamidowe. Jego aktywność była ponad dwukrotnie większa od kobinamidu **1**.

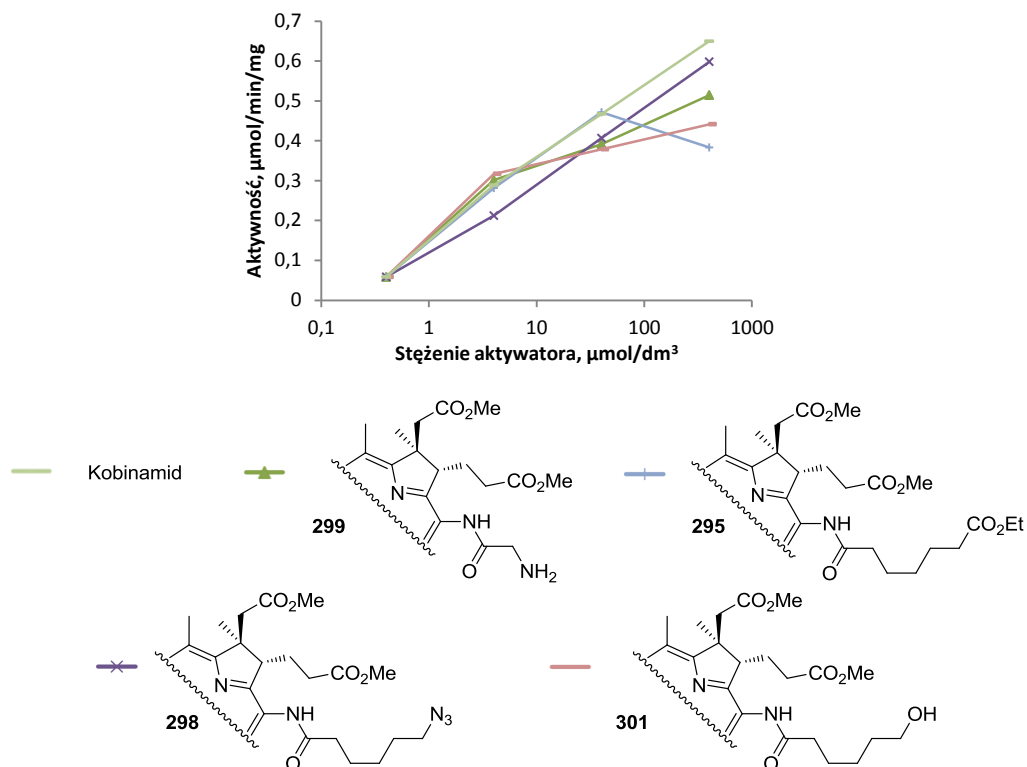


Wykres 3. Względna zdolność do aktywacji sGC w odniesieniu do kobinamidu 1.

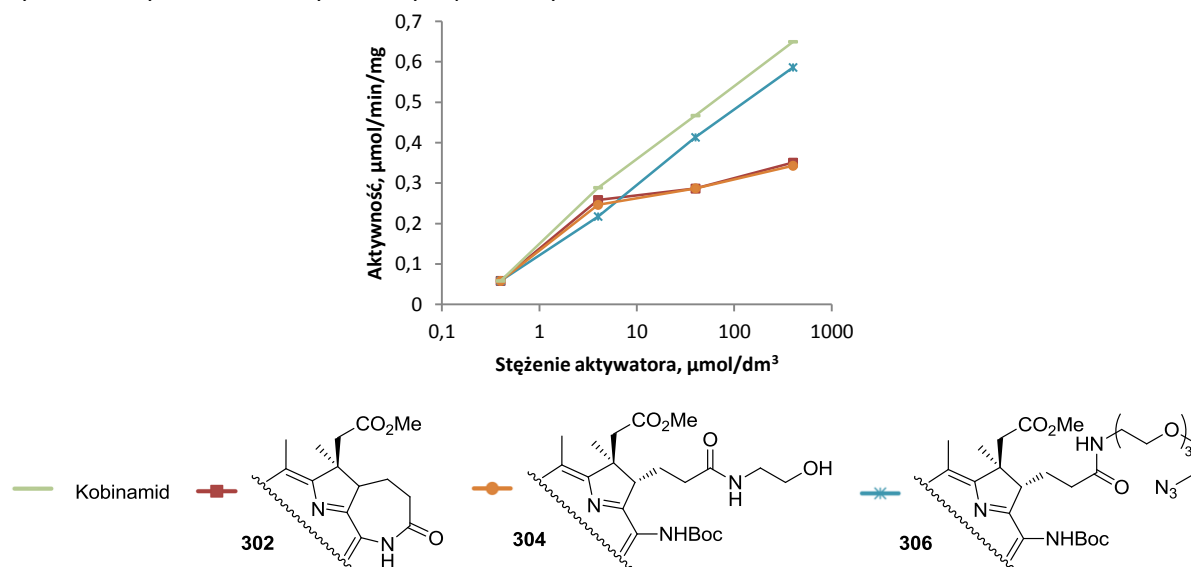


Wszystkie *mezo*-amidy, które zostały przebadane wykazały podobną, choć nieco mniejszą, aktywność w porównaniu do kobinamidu (Wykres 4). Jedynie w przypadku pochodnej **295** posiadającej terminalny ester etylowy zanotowano spadek aktywności przy dużym stężeniu. Wydaje się, że obecność podstawników w pozycji *mezo*- nie ma istotnego wpływu na aktywność badanego związku.

Wykres 4. Aktywność mezo-zmodyfikowanych pochodnych.



Wśród przetestowanych związków, które posiadały selektywne modyfikacje w pozycji *d*- najlepsze wyniki uzyskano aktywując sGC związkiem **306** posiadającym w pozycji *d*- krótki łańcuch glikolowy zakończony grupą azydkową (Wykres 5). Jednak, żaden ze związków nie posiadał lepszej zdolności do aktywacji sGC niż kobinamid **1**.

Wykres 5. Aktywność *d*-zmodyfikowanych pochodnych.

Wylimitowanie ze struktury łańcucha *d*- wpływa niekorzystnie na właściwości biologiczne związków. Pochodne posiadające w pozycji *c*- podstawnik etoksyetanoamidowy znacznie słabiej aktywują sGC. Podstawniki izoprpyloamidowe

w pozycjach *c-* i *d-* zwiększają aktywność związku ponad dwukrotnie. Wprowadzenie podstawników amidowych w pozycję *mezo-* zmniejsza lub nie zmienia zdolności aktywacji sGC badanych związków.

## 4. Podsumowanie i wnioski

Celem mojej pracy było znalezienie metod selektywnych modyfikacji pochodnych kwasu kobyrynowego i zbadanie ich wpływu na rozpuszczalną cyklazę guanylową.

Badania rozpocząłem od otrzymania serii pochodnych heptaestru **3** selektywnie zmodyfikowanych w pozycji *c*-. **Opracowałem efektywną metodę otwierania *c*-laktanu **4** aminami dającą odpowiednio mono- lub diamidy oraz spiro-lakton **263** w zależności od zastosowanych warunków reakcji.** Stosując opracowane warunki otrzymałem bibliotekę *c*-zmodyfikowanych pochodnych estru metylowego kwasu kobyrynowego. Z kolei, spiro-lakton **263** pozwolił na opracowanie metody selektywnego wprowadzania podstawników w pozycję *d*-. W toku dalszych badań zsyntetyzowałem kilka *c,d*-diamidów. Badania biologiczne otrzymanych związków wykazały, że aktywność silnie zależy od rodzaju podstawnika w pozycji *c*- i *d*-.

Następnie, wykorzystując jako substrat aminę **5**, opracowałem warunki reakcji otrzymywania *mezo*-amidów. Pierwsza polegała na reakcji aminy z cyklicznymi bezwodnikami. Warunki tej reakcji zostały zoptymalizowane, a następnie wykorzystane do syntezy kilku analogów różniących się rodzajem i długością łańcucha amidu w pozycji *mezo*-. Druga metoda polegała na reakcji aminy **5** z kwasami karboksylowymi w obecności odczynników sprzęgających, wykorzystując tę procedurę zsyntetyzowałem *mezo*-amidy posiadających różne terminalne grupy funkcyjne. Ostatnia metoda polegała na wykorzystaniu chlorku oksalilu do generowania *in situ* chlorków kwasów karboksylowych, które następnie reagowały z aminą **5**. Metoda ta pozwoliła mi na otrzymanie kilku *mezo*-amidów, których nie udało mi się otrzymać innymi metodami. Badania biologiczne wykazały, że związki modyfikowane w pozycji *mezo*- aktywują sGC znacznie słabiej niż kobinamid.

**Za ważne osiągnięcie uważam odkrycie *mezo-d*-laktanu **302**. Opracowałem wydajną metodę otrzymywania tego związku i wykazałem jego użyteczność jako prekursora modyfikowanych w pozycji *d*- pochodnych kwasu kobyrynowego.** Polega ona na otwieraniu pierścienia laktanu aminami i pozwoliła mi na otrzymanie serii *d*-amidów. Niestety, związki te nie były lepszymi aktywatorami sGC niż dotychczas zbadane pochodne kwasu kobyrynowego.

Następnie próbowałem opracować metodę bezpośredniej funkcjonalizacji prostych pochodnych kwasu kobyrynowego w pozycji *mezo*-. Z badań tych wynika, że w klasycznych warunkach dla reakcji Sonogashiry nie następuje zerwanie wiązania C–X lecz Co–CN i ostatecznie zachodzi alkilowanie atomu kobaltu. W przypadku prób wprowadzania

w pozycję *mezo*- podstawników na drodze bezpośredniego arylowania okazało się, że pomimo wyboru opisanych w literaturze łagodnych warunków, substrat **3** jest niewystarczająco trwały i najczęściej zachodzi jego degradacja. **Jednak najważniejszym owocem tych prac było odkrycie kobryketonu 313 – związku powstającego przez selektywne rozerwanie wiązania C–C. Jest to pierwszy przykład trwałego analogu heptaestru 3 nie posiadającego podstawnika w pozycji *d*-, tzw. *nor*-pochodnej.** Zoptymalizowałem syntezę kobryketonu oraz podjąłem próby wyjaśnienia mechanizmu jego powstawania. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły stwierdzić, że elementem odrywającym się od koryny jest 3-hydroksypropionian metylu, a substratem niezbędnym do zajścia reakcji jest tlen. Na podstawie doniesień z literatury zasugerowałem, że mechanizm tworzenia kobryketonu przebiega w sposób opisany przez Miurę i współpracowników i zakłada jako etap kluczowy katalizowane palladem rozerwanie wiązania C(sp<sup>3</sup>)–C(sp<sup>3</sup>). **Następnie, w wyniku redukcji kobryketonu 313 otrzymałem *nor*-*c*-kwas 328, który jest prekursorem *c*-zmodyfikowanych pochodnych z wyeliminowaną pozycją *d*-. Związek ten wykorzystałem do syntezy kilku takich analogów. Badania biologiczne pozwoliły na stwierdzenie, że obecność podstawnika w pozycji *d*- jest istotna w kontekście wiązania koryny do enzymu, bowiem związek nie posiadający tego elementu struktury wykazywał znacznie mniejszą aktywność względem analogu posiadającego pozycję *d*-.**

Ostatnią częścią mojej pracy było zaplanowanie syntezy i otrzymanie pochodnej nie posiadającej podstawników w pozycjach *c*- i *d*-. Na podstawie literatury wytyczyłem dwie ścieżki syntezy, z których tylko jedna okazała się możliwa do przeprowadzenia. **Ostatecznie udało mi się otrzymać pentaester 336.** Związek ten posiadał niespodziewane właściwości biologiczne. W niskich stężeniach posiadała aktywność podobną do swojego analogu, heptaestru **3**, z kolei w wyższych stężeniach obserwowano inhibicję enzymu.

Wyniki uzyskane w toku mojej pracy doktorskiej uważam za bardzo cenne i znacznie wzbogacające zakres wiedzy na temat selektywnych modyfikacji pochodnych kwasu kobrynowego. Otrzymane przeze mnie pochodne mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia sposobu aktywacji sGC i w przyszłości przyczynić się do otrzymania aktywatora tego enzymu nie posiadającego wad obecnie stosowanych leków.

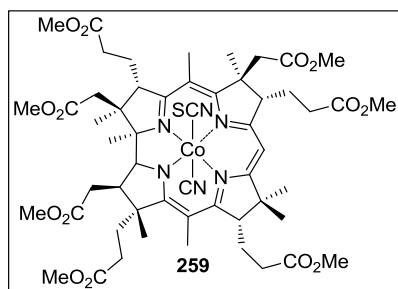
## 5. Część eksperymentalna

### 5.1. Informacje ogólne

- Bezwodne rozpuszczalniki przygotowywane były zgodnie z procedurami literaturowymi.<sup>210</sup> Odczynniki dostępne handlowo używane były bez dodatkowego oczyszczania.
- **Chromatografia:** Do chromatografii DCVC (*ang.* – Dry Column Vacuum Chromatography) używano żelu krzemionkowego GF<sub>254</sub> o wielkości ziaren 10-40  $\mu\text{m}$ .<sup>211</sup> Chromatografia TLC była wykonywana na płytkach aluminiowych pokrytych warstwą żelu krzemionkowego (0.20 mm) z indykatorem – Silica Gel F<sub>254</sub> lub tlenku glinu (0.20 mm) – Aluminiumoxid 60 F<sub>254</sub>. Rozpuszczalniki używane jako eluenty posiadały czystość co najmniej cz.d.a. lub były destylowane przed użyciem. W przypadkach chromatografii na SiO<sub>2</sub> do eluentów stosowano dodatek NaCN, jeśli nie wspomniano inaczej.
- **Temperatury topnienia** nie były korygowane.
- **Widma spektrometrii mas** wykonywane były na aparatach 4000 Q-TRAP (Applied Biosystems) i SYNAPT G2-S HDMS (Waters).
- **Widma w podczerwieni** wykonywane były na aparacie Perkin-Elmer 1640 FT-IR. Próbkę do pomiaru przygotowywane były w postaci pastylek z KBr.
- **Widma UV/Vis** rejestrowane były w DCM (jeśli nie wspomniano inaczej) na aparatach Perkin-Elmer  $\lambda$ -25 lub Jenaway 7315.
- **Widma NMR** rejestrowane były na aparatach Bruker 500 MHz lub Varian 500 MHz. Przesunięcia chemiczne podano w ppm i kalibrowano na sygnał TMS lub reszkowe sygnały rozpuszczalników.
- 2-(2-(2-(2-Azydoetoksy)etoksy)etoksy)etyloamina, 6-azydo-*n*-heksyloamina i kwas 6-azydoheksanowy były dostępne w laboratorium.
- Następujące związki otrzymano według procedur literaturowych: **5**,<sup>150</sup> **318**,<sup>212</sup> wodoroadypinian *tert*-butylu,<sup>213</sup> wodoroadypinian etylu,<sup>214</sup> kwas 6-((*tert*-butylodimetylosilil)oksy)heksanowy,<sup>215</sup> 3-hydroksypropionian metylu oraz 3-hydroksypropionian *n*-butylu.<sup>216</sup>

## 5.2. Opis syntez i charakterystyka nieznanych związków

### (SCN)(CN)Cby(III)(OMe)<sub>7</sub> (259)



Heptaester **3** (30 mg, 0.03 mmol) rozpuszczono w DCM (5 mL) i wytrząsano z wodnym roztworem kwasu nadchlorowego (30%, 5 mL) do zmiany koloru roztworu z fioletowego na pomarańczowy (około minuty), a następnie fazę organiczną wytrząsano z nasyconym roztworem rodanku potasu (3 mL) do czasu całkowitej konsumpcji

substratu (TLC, SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH 5%, bez dodatku NaCN w eluencie). Produkt ekstrahowano DCM (2×5 mL), połączone ekstrakty organiczne osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalniki. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczano metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCVC, SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH 1-5% bez dodatku NaCN w eluencie). Główną frakcją zawierającą pożądaný produkt odparowano, suchą pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości benzenu i strącono *n*-heksanem. Osad odwirowano i osuszono. Pożądaný związek otrzymano w postaci czerwonego proszku (28 mg, 90%).  $R_f = 0.44$  (SiO<sub>2</sub>, toluen/DCM/*i*-PrOH, 10/10/1). Anal. elem. obliczono dla C<sub>54</sub>H<sub>73</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S+½H<sub>2</sub>O: C 57.39, H 6.60, N 7.44, S 2.84; otrzymano: C 57.28, H 6.58, N 7.41, S 3.01. LRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>54</sub>H<sub>73</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S [M]<sup>+</sup> 1120.4; otrzymano: 1120.4, profil izotopowy zgodny z teoretycznym. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 274 (1.62×10<sup>4</sup>), 304 (1.35×10<sup>4</sup>), 362 (2.94×10<sup>4</sup>), 415 (4.34×10<sup>3</sup>), 523 (1.16×10<sup>4</sup>), 556 (1.34×10<sup>4</sup>) nm. IR (KBr)  $\nu$ : 3453, 2952, 2134, 2078, 1734, 1581, 1501, 1436, 1393, 1367, 1353, 1300, 1202, 1153, 1104, 1003, 885, 806, 738, 684, 619, 482 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 5.92-5.89 (m, 1H), 4.01 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H), 3.88-3.80 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.70 (s, 6H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.64 (s, 1H), 3.62 (s, 2H), 3.59 (s, 1H), 3.19 (m, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.8-2.6 (m, 4H), 2.6-2.4 (m, 5H), 2.4-2.1 (m, 15H), 1.9-1.7 (m, 3H), 1.67 (s, 2H), 1.62 (s, 1H), 1.59 (s, 1H), 1.48 (s, 2H), 1.45 (s, 1H), 1.42 (s, 3H), 1.37 (s, 2H), 1.33-1.28 (m, 4H), 1.18 (s, 2H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 176.7, 176.2, 176.1, 173.9, 173.8, 173.7, 173.5, 173.1, 173.0, 173.0, 172.9, 172.5, 172.2, 172.1, 171.2, 171.1, 164.1, 164.0, 104.6, 104.5, 103.2, 92.6, 84.2, 83.1, 75.2, 75.1, 58.9, 57.5, 57.0, 54.8, 54.7, 54.3, 52.6, 52.6, 52.1, 52.1, 52.0, 52.0, 52.0, 51.9, 51.8, 51.8, 51.8, 51.7, 49.6, 49.1, 47.7, 47.6, 46.3, 46.1, 43.1, 42.3, 41.6, 41.5, 39.7, 39.7, 34.0, 32.9, 32.7, 32.1, 32.0, 31.9, 31.6, 31.2, 31.2, 31.1, 30.9, 30.1, 29.9, 27.1, 26.9, 26.5, 26.0, 25.5, 25.4, 23.4, 22.3, 20.2, 20.0, 19.7, 19.7, 19.5, 19.4, 18.4, 17.2, 17.1, 16.3, 16.2, 15.8, 15.6 ppm.

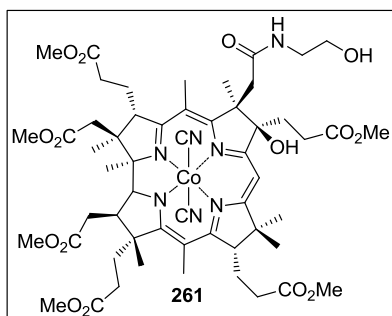
## 1. Otwieranie laktonów

Odpowiedni lakton (15 mg, 14  $\mu\text{mol}$ ) i pierwszorzędową aminę (0.14 mmol) mieszano w 1,4-dioksanie (1 mL), w temperaturze pokojowej, w atmosferze argonu. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono DCM i przemyto solanką. Fazę organiczną osuszono bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Otrzymaną surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym.

## 2. Otrzymywanie diamidów z *c*-laktonu

*c*-Lakton<sup>155</sup> **4** (15 mg, 14  $\mu\text{mol}$ ) rozpuszczono w DCM (1 mL), a następnie w atmosferze argonu wkroplono aminę (0.1 mL). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez określony dla danej aminy czas, w atmosferze argonu. Reakcję rozcieńczono DCM i przemyto solanką. Fazę organiczną osuszono bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Otrzymaną surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym.

### (CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c*-(2-hydroksyetyloamid))(8-OH)(OMe)<sub>6</sub> (**261**)



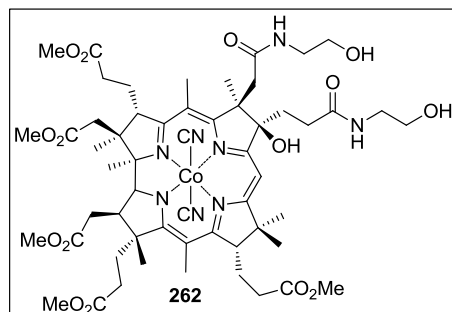
Otrzymano według procedury 1: *c*-Lakton **4** (29 mg, 0.03 mmol) i etanoloaminę (30  $\mu\text{L}$ , 0.27 mmol) mieszano w 1,4-dioksanie (2 mL) przez 5 godzin. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5-5%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały

osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt **261** otrzymano w postaci fioletowego proszku (22 mg, 72%).  $R_f = 0.20$  ( $\text{SiO}_2$ , DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla  $\text{C}_{55}\text{H}_{76}\text{CoN}_7\text{O}_{15}+2\text{H}_2\text{O}$ : C 56.45, H 6.89, N 8.38; otrzymano: C 56.16, H 7.09, N 8.18. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $\text{C}_{54}\text{H}_{76}\text{CoN}_6\text{O}_{15} [\text{M}-\text{CN}]^+$  1107.469; otrzymano: 1107.469. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$ ): 281 ( $8.99\times 10^3$ ), 319 ( $9.11\times 10^3$ ), 371 ( $2.64\times 10^4$ ), 552 ( $7.84\times 10^3$ ), 591 ( $9.76\times 10^3$ ) nm.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 6.97 (t,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 5.72 (s, 1H), 3.77 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.74 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.67 (s, 9H), 3.61 (s, 3H), 3.5-3.4 (m, 2H), 3.3-3.1 (m, 2H), 3.07 (dd,  $J = 3.6, 6.3$  Hz, 1H), 2.82-2.77 (m, 1H), 2.7-2.4 (m, 10H), 2.33-2.29 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.2-1.9 (m, 7H), 2.10 (s, 3H), 1.9-1.6 (m, 5H), 1.67 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.20 (s, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 176.8, 176.7, 176.5, 175.9, 174.0, 173.1, 172.9, 172.8, 172.1, 172.0, 171.9, 163.5, 159.5, 106.9, 103.1, 90.0, 85.6, 83.1, 74.9, 61.4, 58.8, 56.9, 56.5,



52.6, 52.5, 52.2, 52.1, 52.0, 51.8, 47.1, 46.5, 43.6, 42.7, 42.0, 39.7, 33.9, 32.6, 32.0, 31.8, 31.7, 30.9, 30.0, 29.9, 25.9, 25.3, 22.3, 19.6, 18.2, 17.2, 17.1, 15.7, 15.6 ppm.

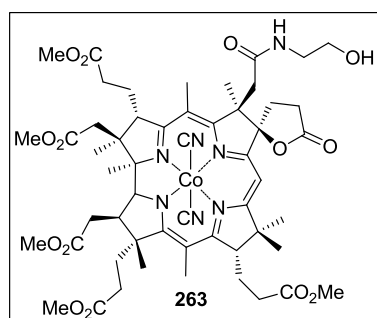
**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c*-*d*-di-(2-hydroksyetylo)amid)(8-OH)(OMe)<sub>5</sub> (262)**



Otrzymano według procedury 2: *c*-Lakton 4 (14 mg, 13 μmol) i etanoloaminę (0.1 mL, 6.1 mmol) mieszano w DCM (1 mL) przez 6 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 5-10%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt

i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt otrzymano w postaci fioletowego proszku (11 mg, 75%).  $R_f = 0.22$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 10%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>56</sub>H<sub>79</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>15</sub>+2H<sub>2</sub>O: C 56.09, H 6.98, N 9.34; otrzymano: C 56.48, H 6.98, N 9.31. UV/Vis, λ (ε, M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 282 (8.99×10<sup>3</sup>), 319 (9.09×10<sup>3</sup>), 372 (2.68×10<sup>4</sup>), 553 (7.71×10<sup>3</sup>), 592 (9.84×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ: 7.99 (t,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 6.95 (bs, 1H), 6.51 (bs, 1H), 5.80 (s, 1H), 3.81 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.68 (s, 6H), 3.67 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.53 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 3.47 (m, 2H), 3.42 (m, 1H), 3.29-3.23 (m, 2H), 3.20-3.14 (m, 3H), 3.09 (t,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 2.81-2.77 (m, 1H), 2.7-2.6 (m, 2H), 2.5-2.3 (m, 6H), 2.27 (s, 3H), 2.2-2.1 (m, 9H), 1.89 (m, 1H), 1.8-1.7 (m, 6H), 1.64 (s, 3H), 1.52 (m, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.73 (s, 6H), 1.27 (s, 3H), 1.19 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ: 176.1, 175.5, 174.2, 173.5, 173.4, 172.4, 172.3, 171.6, 171.4, 162.6, 159.3, 106.0, 102.4, 89.9, 85.4, 82.6, 74.4, 61.1, 60.6, 58.3, 56.3, 55.9, 52.0, 51.6, 51.5, 51.43, 51.40, 46.4, 45.8, 43.1, 42.5, 42.3, 41.4, 39.1, 33.5, 33.3, 32.1, 32.0, 31.2, 31.1, 30.1, 29.4, 24.9, 24.5, 21.6, 18.8, 17.6, 16.6, 15.0, 14.9 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c*-(2-hydroksyetylo)amid)(8-O-*c*-lakton)(OMe)<sub>5</sub> (263)**



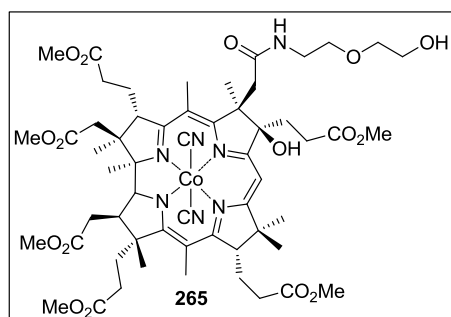
Monoamid 261 (15 mg, 13 μmol) oraz KCN (15 mg, 2.3 mmol) mieszano w 1,4-dioksanie (1 mL), w temperaturze pokojowej przez 2 dni. Reakcję rozcieńczono DCM i przemyto solanką. Fazę organiczną osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalników otrzymano surową mieszaninę reakcyjną,

którą oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/EtOH, 2.5%). Główna frakcja zawierała produkt. Suchą pozostałość po jej odparowaniu,

rozpuszczono w minimalnej ilości etanolu i strącono eterem dietylowym, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt **263** otrzymano w postaci fioletowoczerwonego proszku (12 mg, 83%).  $R_f = 0.29$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>54</sub>H<sub>72</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>14</sub>+2H<sub>2</sub>O: C 56.99, H 6.73, N 8.61; otrzymano: C 57.05, H 6.76, N 8.68. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>54</sub>H<sub>72</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>14</sub> [M]<sup>+</sup> 1101.4463; otrzymano: 1101.4412. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 277 (2.18×10<sup>4</sup>), 313 (9.66×10<sup>3</sup>), 369 (2.73×10<sup>4</sup>), 549 (8.28×10<sup>3</sup>), 588 (9.71×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 6.99 (t,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 5.57 (s, 1H), 3.75 (m, 5H), 3.70 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.44 (m, 2H), 3.19-3.17 (m, 2H), 2.80 (m, 1H), 2.73-7.63 (m, 6H), 2.52-2.47 (m, 3H), 2.44-2.38 (m, 3H), 2.30 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.21-2.15 (m, 5H), 2.1-2.0 (m, 6H), 1.9-1.8 (m, 2H), 1.78 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.20 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 178.5, 176.9, 176.2, 175.5, 173.8, 173.7, 172.9, 172.8, 172.0, 171.9, 170.4, 168.7, 163.4, 156.6, 108.2, 104.2, 93.7, 86.4, 83.4, 75.1, 61.4, 59.0, 57.0, 54.9, 54.2, 52.7, 52.7, 52.2, 52.1, 52.0, 51.8, 47.6, 46.5, 43.8, 42.7, 42.0, 40.0, 39.7, 33.9, 32.5, 31.9, 31.8, 30.8, 29.9, 28.8, 28.0, 25.7, 22.3, 19.7, 18.1, 17.2, 16.8, 15.8, 15.4 ppm.

Numer depozytu w baize CCDC 789895.

#### (CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c*-(2-(2-hydroksyetoksy)etyloamid))(8-OH)(OMe)<sub>6</sub> (**265**)

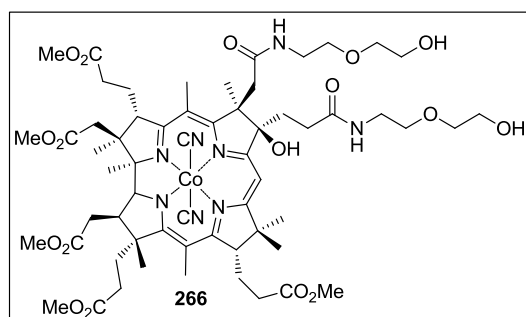


Otrzymano według metody **1**: *c*-Lakton **4** (16 mg, 15  $\mu$ mol) i 2-(2-aminoetoksy)etanol (15  $\mu$ L, 0.15 mmol) mieszano w 1,4-dioksanie (1 mL) przez 16 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5-5%). Otrzymany produkt rozpuszczono

w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt **265** otrzymano w postaci fioletowego proszku (14 mg, 84%).  $R_f = 0.44$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 10%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>57</sub>H<sub>80</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>16</sub>+2H<sub>2</sub>O: C 56.38, H 6.87, N 8.07; otrzymano: C 56.03, H 6.87, N 7.70. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>56</sub>H<sub>80</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>16</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1151.4962; otrzymano: 1151.4957. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 282 (8.99×10<sup>3</sup>), 319 (9.09×10<sup>3</sup>), 372 (2.68×10<sup>4</sup>), 553 (7.71×10<sup>3</sup>), 592 (9.84×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 7.36 (bs, 1H), 5.92 (bs, 0.3H), 5.78 (bs, 0.7H), 5.71 (s, 0.7H), 5.60 (s, 0.3H), 3.90 (d,  $J = 11$  Hz, 0.3H), 3.80-3.76 (m, 1.7 H), 3.75 (s, 2H), 3.74 (s, 1H), 3.72-3.68 (m, 11 H), 3.61 (s, 2H), 3.60 (s, 1H), 3.56-3.46 (m, 4H), 3.4-3.3 (m, 5H), 3.2-3.1 (m, 0.6H), 3.1-3.0 (m, 1.4H), 2.30-2.28 (m, 11H), 2.24 (s, 3H), 2.2-2.1 (m, 4H), 2.10 (s, 2H), 2.09 (s, 1H),

2.1-2.0 (m, 3H), 1.9-1.7 (m, 3H), 1.68 (s, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.61 (s, 1.4H), 1.58 (s, 0.6 H), 1.47 (s, 2H), 1.43 (s, 1H), 1.35 (s, 6H), 1.27 (s, 3H), 1.25 (s, 1H), 1.21 (s, 1H), 1.18 (s, 2H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 177.1, 176.7, 176.6, 176.4, 176.3, 176.0, 175.9, 175.82, 175.79, 174.0, 173.8, 173.1, 172.9, 172.4, 172.3, 172.22, 172.21, 172.1, 171.8, 163.5, 163.2, 160.3, 159.7, 106.7, 106.6, 103.1, 90.5, 89.9, 85.3, 83.8, 83.1, 75.1, 74.9, 72.9, 72.8, 69.9, 69.8, 61.7, 61.6, 58.9, 58.8, 56.9, 56.3, 56.1, 52.6, 52.4, 52.2, 52.1, 52.0, 51.9, 51.85, 51.80, 47.2, 47.1, 47.0, 42.9, 42.5, 42.4, 42.2, 40.2, 40.1, 39.7, 39.5, 34.0, 32.7, 32.6, 32.5, 32.0, 31.8, 31.5, 31.0, 30.7, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 25.9, 25.8, 25.5, 25.3, 22.2, 21.8, 19.9, 19.7, 18.2, 17.9, 17.3, 17.2, 16.7, 15.7, 15.6, 15.4 ppm.

**(CN) $_2$ Cby(III)(*c-d*-di-(2-(2-hydroksyetoksy)etylo)amid)(8-OH)(OMe) $_5$  (266)**

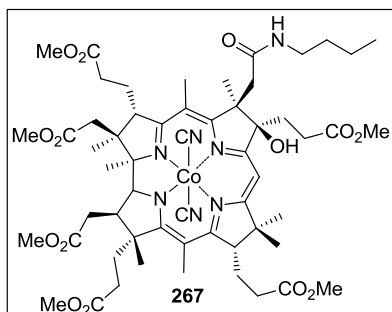


Otrzymano według procedury 2: *c*-Lakton 4 (25 mg, 0.02 mmol) i 2-(2-aminoetoksy)etanol (0.1 mL, 1.4 mmol) mieszano w DCM (2 mL) przez 5 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2-5%). Otrzymany produkt

rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Požadany produkt **266** otrzymano w postaci fioletowego proszku (20 mg, 70%).  $R_f$  = 0.22 ( $\text{SiO}_2$ , DCM/EtOH, 10%). Anal. elem. obliczono dla  $\text{C}_{60}\text{H}_{87}\text{CoN}_8\text{O}_{17}+2\text{H}_2\text{O}$ : C 55.98, H 7.12, N 8.70; otrzymano: C 56.18, H 7.13, N 8.72. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $\text{C}_{59}\text{H}_{87}\text{CoN}_7\text{O}_{17} [\text{M}-\text{CN}]^+$  1224.550; otrzymano: 1224.548. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$ ): 372 ( $2.92\times 10^4$ ), 507 ( $5.07\times 10^2$ ), 552 ( $8.48\times 10^3$ ), 591 ( $1.11\times 10^4$ ) nm.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 7.45 (m, 0.2H), 7.39 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 0.8H), 7.35 (m, 0.8H), 7.33 (m, 0.2H), 6.56 (bs, 0.8H), 6.49 (bs, 0.2H), 5.78 (s, 0.8H), 5.64 (s, 0.2H), 4.04 (bs, 1H), 3.94 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 0.2H), 3.82 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 0.8H), 3.75 (s, 3H), 3.74 (m, 1H), 3.69-3.68 (m, 10H), 3.60 (s, 2H), 3.59 (s, 1H), 3.26-3.18 (m, 0.4H), 3.10-3.02 (m, 1.6H), 2.82-2.76 (m, 1H), 2.7-2.3 (m, 12H), 2.25 (s, 2H), 2.24 (s, 1H), 2.2-2.0 (m, 5H), 2.11 (s, 2H), 2.09 (s, 1H), 1.88-1.80 (m, 2H), 1.77 (bs, 4H), 1.63 (s, 2H), 1.58 (s, 1H), 1.43 (s, 2H), 1.39 (s, 1H), 1.36 (s, 1H), 1.28 (s, 3H), 1.26 (s, 1H), 1.22 (s, 1H), 1.19 (s, 2H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 177.0, 176.7, 176.5, 176.1, 175.9, 174.2, 173.3, 173.1, 172.9, 172.2, 171.5, 163.3, 160.9, 160.4, 106.2, 103.1, 102.9, 101.3, 99.9, 90.2, 85.5, 83.8, 83.1, 75.5, 73.3, 73.0, 72.8, 72.7, 69.9, 69.8, 61.6, 61.5, 58.9, 58.8, 56.9, 55.9, 55.8, 52.6, 52.1, 52.0, 51.9, 51.8, 47.1, 46.8, 46.4, 42.6,

42.1, 40.1, 40.0, 39.9, 39.7, 34.1, 34.0, 32.7, 32.4, 31.9, 31.5, 31.0, 30.0, 25.7, 25.1, 22.0, 19.6, 18.3, 17.2, 17.1, 16.5, 15.6, 15.4 ppm.

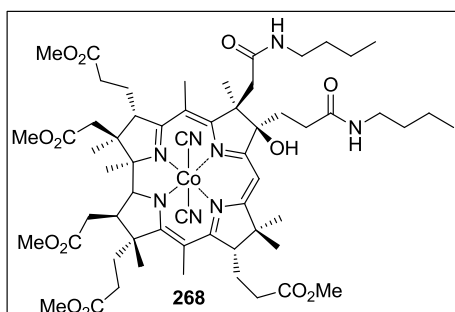
**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c*-(*n*-butyloamid))(8-OH)(OMe)<sub>6</sub> (267)**



Otrzymano według procedury 1: *c*-Lakton 4 (15 mg, 14 μmol) i *n*-butyloaminę (14 μL, 0.14 mmol) mieszano w 1,4-dioksanie (1 mL) przez 16 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono

*n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt 267 otrzymano w postaci fioletowego proszku (10 mg, 65%).  $R_f = 0.20$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>57</sub>H<sub>80</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>14</sub>+H<sub>2</sub>O: C 58.80, H 7.10, N 8.42; otrzymano: C 59.23, H 7.07, N 8.25. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>57</sub>H<sub>80</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>14</sub> [M]<sup>+</sup> 1145.5095; otrzymano: 1145.5112. UV/Vis, λ (ε, M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 282 (8.88×10<sup>3</sup>), 319 (9.22×10<sup>3</sup>), 372 (2.74×10<sup>4</sup>), 592 (1.06×10<sup>4</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>) δ: 8.08 (bs, 1H), 6.10 (s, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.35-3.29 (m, 1H), 2.9-2.7 (m, 6H), 2.30 (s, 3H), 2.18 (s, 4H), 2.11-2.09 (s, 6H), 2.1-1.9 (m, 3H), 1.8-1.7 (m, 6H), 1.5-1.4 (m, 5H), 1.3-1.1 (m, 2H), 1.20 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.87-0.84 (m, 7H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>) δ: 176.5, 175.7, 175.2, 174.6, 173.8, 173.7, 172.7, 172.3, 172.2, 172.1, 171.8, 163.4, 161.2, 102.4, 96.5, 90.9, 85.6, 83.0, 75.1, 58.6, 56.7, 56.3, 54.1, 51.68, 51.63, 51.3, 51.2, 51.0, 50.9, 46.7, 46.4, 42.7, 42.2, 40.0, 39.9, 33.7, 33.3, 32.9, 31.8, 31.7, 31.1, 30.3, 29.8, 29.7, 25.7, 25.1, 22.4, 19.3, 18.0, 17.1, 16.9, 15.9, 15.5, 13.8 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c*-*d*-di-*n*-butyloamid)(8-OH)(OMe)<sub>5</sub> (268)**

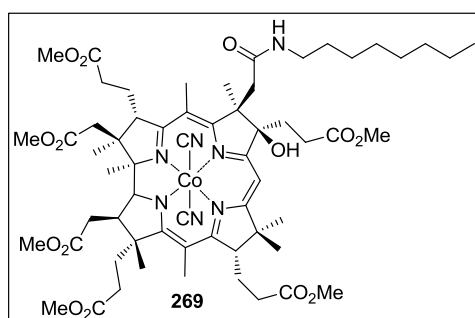


Otrzymano według procedury 2: *c*-Lakton 4 (15 mg, 15 μmol) i *n*-butyloaminę (0.1 mL, 1.0 mmol) mieszano w DCM (1 mL) przez 16 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt

i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt 268 otrzymano w postaci fioletowego proszku (7 mg, 41%).  $R_f = 0.19$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>60</sub>H<sub>87</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>13</sub>+H<sub>2</sub>O: C 59.79, H 7.44, N 9.30; otrzymano:

C 59.79, H 7.81, N 9.28. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $C_{60}H_{87}CoN_8O_{13}$   $[M]^+$  1186.5719; otrzymano: 1186.5723. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $M^{-1}\times cm^{-1}$ ): 283 ( $9.30\times 10^3$ ), 321 ( $9.26\times 10^3$ ), 374 ( $2.68\times 10^4$ ), 555 ( $8.12\times 10^3$ ), 593 ( $1.03\times 10^4$ ) nm.  $^1H$  NMR (500 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 7.70 (bs, 0.7H), 7.62 (bs, 0.3H), 7.3-7.1 (m, 1H), 6.10 (s, 0.7H), 5.95 (s, 0.3H), 4.03 (d,  $J = 6.4$  Hz, 0.2H), 4.0-3.9 (m, 0.8H), 3.86-3.81 (m, 1H), 3.48-3.46 (m, 6H), 3.44 (s, 3H), 3.43 (s, 2H), 3.41 (s, 2H), 3.37 (s, 1H), 3.35 (s, 1H), 3.21 (s, 1H), 3.17-3.07 (m, 2H), 2.84-2.68 (m, 6H), 2.28 (s, 2H), 2.25 (s, 1H), 2.19 (s, 2H), 2.16 (s, 1H), 2.1-1.9 (m, 3H), 1.86 (s, 2H), 1.82 (s, 1H), 1.8-1.7 (m, 3H), 1.53-1.50 (m, 2H), 1.45-1.39 (m, 4H), 1.36-1.25 (q,  $J = 4.6$  Hz, 4H), 1.23 (s, 3H), 1.11-1.04 (m, 5H), 0.94 (s, 3H), 0.88-0.83 (m, 7H), 0.61 (bs, 5H) ppm.  $^{13}C$  NMR (125 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 176.4, 176.2, 176.0, 175.4, 173.5, 172.5, 172.6, 172.1, 171.9, 171.6, 163.3, 116.7, 102.3, 96.5, 91.0, 86.3, 83.3, 74.9, 58.7, 54.2, 51.6, 51.5, 51.2, 51.1, 50.9, 46.6, 46.5, 46.4, 42.2, 39.9, 39.6, 39.5, 33.8, 32.9, 32.8, 31.9, 31.7, 31.6, 31.2, 30.6, 30.4, 29.7, 25.6, 25.0, 22.1, 18.0, 17.7, 16.9, 16.6, 15.6, 15.3, 15.1, 14.0, 13.8 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c*-(*n*-oktyloamid))(8-OH)(OMe)<sub>6</sub> (269)**

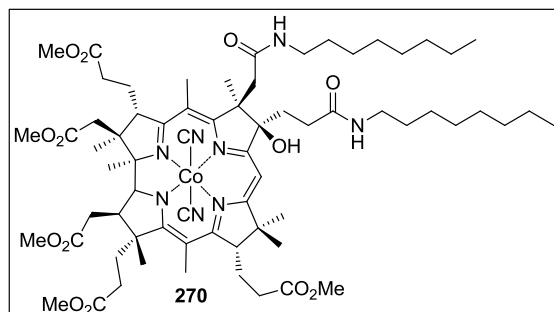


Otrzymano według procedury **1**: *c*-Lakton **4** (16 mg, 15  $\mu$ mol) i *n*-oktyloaminę (22  $\mu$ L, 0.15 mmol) mieszano w 1,4-dioksanie (1 mL) przez 24 godziny. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5%). Otrzymany produkt rozpuszczono

w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany produkt **269** otrzymano w postaci fioletowego proszku (11 mg, 67%).  $R_f = 0.25$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla  $C_{61}H_{88}CoN_7O_{14}+H_2O$ : C 60.04, H 7.43, N 8.03; otrzymano: C 60.03, H 7.39, N 7.98. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $C_{61}H_{88}CoN_7O_{14}$   $[M]^+$  1201.5715; otrzymano: 1201.5739. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $M^{-1}\times cm^{-1}$ ): 281 ( $9.96\times 10^3$ ), 319 ( $9.54\times 10^3$ ), 372 ( $2.66\times 10^4$ ), 554 ( $8.51\times 10^3$ ), 592 ( $9.84\times 10^3$ ) nm.  $^1H$  NMR (500 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 8.18 (bs, 1H), 6.11 (bs, 1H), 4.0-3.9 (m, 2H), 3.51 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 3.40-3.32 (m, 6H), 3.34-3.32 (m, 6H), 3.2-3.1 (m, 1H), 2.85-2.75 (m, 3H), 2.73-2.70 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 2.7-2.5 (m, 6H), 2.24-2.20 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.02-1.94 (m, 2H), 1.8-1.7 (m, 6H), 1.54-1.51 (t,  $J = 3.0$  Hz, 2H), 1.44-1.39 (m, 3H), 1.25-1.15 (m, 18H), 1.11 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.87-0.82 (m, 6H) ppm.  $^{13}C$  NMR (125 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 176.6, 175.7, 175.4, 175.3, 174.6, 173.7, 172.7, 172.3, 172.2, 172.1, 171.8, 163.5, 102.5, 91.0, 85.7, 83.0, 75.1, 58.7, 56.7, 54.2, 51.6, 51.3, 51.2, 51.0, 50.9, 46.7, 46.4, 42.3, 40.4, 39.9, 33.7, 32.9, 32.3, 31.8,

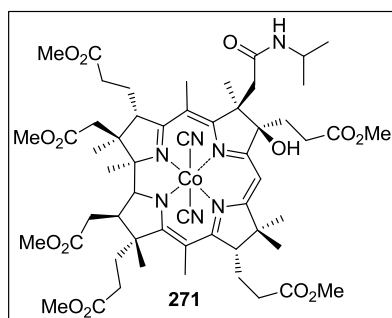
31.1, 30.3, 29.86, 29.80, 29.7, 27.6, 25.7, 25.1, 23.1, 22.4, 19.3, 18.0, 17.1, 16.9, 15.9, 15.5, 14.3 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c-d-di-n-oktyloamid*)(8-OH)(OMe)<sub>5</sub> (270)**



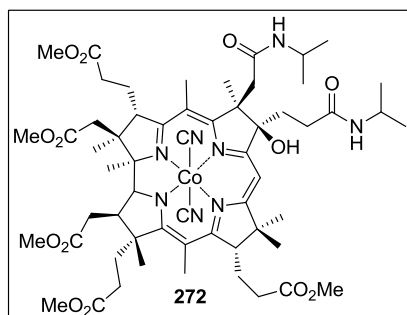
Otrzymano według procedury 2: *c*-Lakton 4 (15 mg, 14  $\mu$ mol) i *n*-oktyloaminę (0.1 mL, 0.6 mmol) mieszano w DCM (1 mL) przez 24 godziny. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5%).

Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany produkt **270** otrzymano w postaci fioletowego proszku (7 mg, 41%).  $R_f = 0.32$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>68</sub>H<sub>103</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>13</sub>+H<sub>2</sub>O: C 61.99, H 8.03, N 8.50; otrzymano: C 61.90, H 8.01, N 8.31. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>68</sub>H<sub>103</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>13</sub> [M]<sup>+</sup> 1298.6976; otrzymano: 1298.6982. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 281 (8.87×10<sup>3</sup>), 319 (9.46×10<sup>3</sup>), 372 (2.58×10<sup>4</sup>), 553 (7.84×10<sup>3</sup>), 591 (9.95×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 7.19 (bs, 0.8H), 6.99 (bs, 0.2H), 6.66 (t,  $J = 3.4$  Hz, 0.7H), 6.63-6.60 (t,  $J = 3.4$  Hz, 0.3H), 5.77 (s, 0.7H), 5.62 (s, 0.3H), 3.82 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.68 (m, 7H), 3.66 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.23 (m, 1H), 3.10-3.04 (m, 3H), 2.82-2.76 (m, 2H), 2.7-2.6 (m, 2H), 2.25 (s, 2H), 2.23 (s, 1H), 2.2-2.0 (m, 10H), 1.64 (s, 2.4H), 1.60 (s, 0.6H), 1.43 (s, 2H), 1.40 (m, 2H), 1.36 (bs, 4H), 1.33 (s, 4H), 1.28-1.25 (m, 18H), 1.20-1.18 (m, 15H), 0.88-0.83 (m, 8H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 176.9, 176.6, 176.5, 176.3, 175.8, 175.6, 174.3, 174.1, 173.7, 173.1, 172.9, 172.2, 172.0, 171.4, 163.4, 163.2, 160.1, 106.4, 102.7, 96.4, 90.9, 90.2, 85.8, 83.7, 84.1, 74.8, 58.89, 58.85, 56.9, 56.4, 56.3, 54.2, 52.5, 52.14, 52.10, 51.98, 51.92, 47.0, 46.9, 46.8, 46.4, 42.7, 42.0, 40.3, 40.2, 40.0, 39.9, 39.6, 39.5, 33.9, 33.7, 32.7, 32.5, 32.3, 32.2, 32.0, 31.9, 31.5, 30.8, 30.0, 29.8, 29.6, 29.65, 29.62, 29.60, 27.49, 27.44, 27.35, 27.31, 25.9, 25.6, 25.3, 25.1, 23.03, 23.02, 22.2, 19.5, 18.4, 18.1, 17.1, 17.0, 16.6, 15.6, 15.5, 15.4, 14.24, 14.23 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c*-(2-propyloamid))(8-OH)(OMe)<sub>6</sub> (271)**

Otrzymano według procedury 1: *c*-Lakton 4 (16 mg, 14 μmol) i izopropyloaminę (12 μL, 0.14 mmol) mieszano w 1,4-dioksanie (1 mL) przez 5 dni. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono

*n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt 271 otrzymano w postaci fioletowego proszku (4 mg, 25%).  $R_f = 0.37$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>56</sub>H<sub>78</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>14</sub>+H<sub>2</sub>O: C 58.48, H 7.01, N 8.52; otrzymano: C 58.41, H 7.85, N 8.41. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>56</sub>H<sub>78</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>14</sub> [M]<sup>+</sup> 1131.4933; otrzymano: 1131.4921. UV/Vis, λ (ε, M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 319 (1.02×10<sup>4</sup>), 372 (2.62×10<sup>4</sup>), 553 (8.25×10<sup>3</sup>), 592 (1.02×10<sup>4</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>) δ: 7.86 (bs, 1H), 6.09 (bs, 1H), 4.23-4.16 (m, 1H), 3.95 (dd,  $J = 8.7$  oraz 10.2 Hz, 2H), 3.48-3.45 (m, 6H), 3.40-3.38 (m, 6H), 3.34-3.33 (m, 6H), 3.31-3.28 (m, 1H), 2.9-2.7 (m, 6H), 2.65 (s, 1H), 2.23-2.19 (m, 1H), 2.16 (s, 4H), 2.02-1.92 (m, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.76-1.68 (m, 3H), 1.42 (s, 3H), 1.16-1.10 (m, 12H), 1.05 (s, 1H), 1.00 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.86-0.80 (m, 6H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>) δ: 176.5, 175.7, 175.2, 174.8, 173.7, 172.7, 172.3, 171.8, 171.0, 163.4, 161.2, 102.4, 90.8, 85.7, 83.1, 75.1, 58.6, 56.8, 56.5, 54.1, 51.6, 51.5, 51.3, 51.2, 51.0, 50.9, 46.6, 46.0, 42.7, 41.9, 41.6, 39.9, 33.7, 32.9, 31.8, 31.1, 30.3, 29.7, 25.7, 25.0, 22.58, 22.51, 19.3, 18.0, 17.1, 16.6, 16.3, 15.5 ppm.

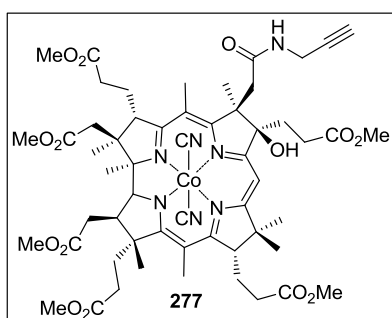
**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c-d*-di-(2-propylo)amid)(8-OH)(OMe)<sub>5</sub> (272)**

Otrzymano według procedury 2: *c*-Lakton 4 (15 mg, 14 μmol) i izopropyloaminę (0.1 mL, 1.2 mmol) mieszano w DCM (1 mL) przez 5 dni. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono

*n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt 272 otrzymano w postaci fioletowego proszku (9 mg, 53%).  $R_f = 0.18$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>58</sub>H<sub>83</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>13</sub>+H<sub>2</sub>O: C 59.53, H 7.34, N 9.37; otrzymano: C 59.53, H 7.25, N 9.37. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>58</sub>H<sub>83</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>13</sub> [M]<sup>+</sup> 1158.5406; otrzymano: 1158.5439. UV/Vis, λ (ε, M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 283 (1.49×10<sup>4</sup>), 321 (9.42×10<sup>3</sup>), 374 (2.67×10<sup>4</sup>), 555 (8.16×10<sup>3</sup>),

593 ( $1.05 \times 10^4$ ) nm.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 7.61 (bs, 1H), 7.42 (bs, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.20 (sext,  $J = 3.9$  Hz, 1H), 4.18 (sext,  $J = 3.9$  Hz, 1H), 3.91 (d,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 3.45 (s, 3H), 3.41-3.40 (m, 12H), 2.9-2.7 (m, 7H), 2.68-2.55 (m, 4H), 2.29 (s, 4H), 2.17 (s, 4H), 2.07-2.00 (m, 5H), 1.85 (bs, 4H), 1.7-1.6 (m, 2H), 1.32 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.13-1.07 (m, 9H), 1.02-0.97 (m, 9H), 0.87 (s, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 176.1, 176.0, 175.3, 173.5, 173.2, 172.7, 172.3, 171.9, 170.8, 163.3, 102.3, 91.1, 86.3, 83.1, 74.9, 58.6, 56.8, 54.2, 51.7, 51.4, 51.27, 51.23, 51.21, 46.5, 46.0, 43.1, 41.7, 39.9, 33.7, 32.9, 31.7, 31.3, 30.9, 29.7, 25.5, 25.0, 22.6, 22.58, 22.52, 22.3, 19.1, 18.0, 16.9, 16.3, 16.1, 15.3 ppm.

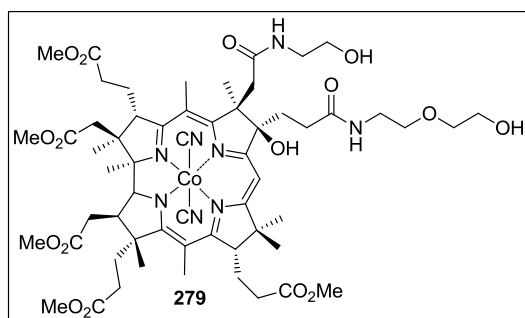
**(CN) $_2$ Cby(III)(*c*-propargiloamid)(8-OH)(OMe) $_6$  (277)**



Otrzymano według procedury 2: *c*-Lakton 4 (14 mg, 13  $\mu\text{mol}$ ) i propargiloaminę (0.1 mL, 1.5 mmol) mieszano w DCM (1 mL) przez 24 godziny. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono

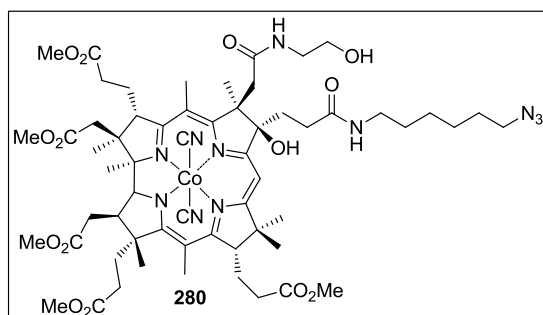
*n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt 277 otrzymano w postaci fioletowego proszku (10 mg, 68%).  $R_f = 0.41$  (SiO $_2$ , DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C $_{56}$ H $_{74}$ CoN $_7$ O $_{14}$ +H $_2$ O: C 58.68, H 6.68, N 8.55; otrzymano: C 58.61, H 6.65, N 8.58. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C $_{55}$ H $_{74}$ CoN $_6$ O $_{14}$  [M-CN] $^+$  1101.4589; otrzymano: 1101.4595. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M $^{-1}$ ×cm $^{-1}$ ): 281 ( $9.80 \times 10^3$ ), 319 ( $9.50 \times 10^3$ ), 372 ( $2.63 \times 10^4$ ), 553 ( $8.33 \times 10^3$ ), 592 ( $1.01 \times 10^4$ ) nm.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 8.33 (bs, 1H), 6.67 (bs, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.0-3.8 (m, 4H), 3.46 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.39 (m, 6H), 3.34 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 2.83-2.77 (m, 3H), 2.7-2.6 (m, 3H), 2.26 (s, 4H), 2.16 (s, 3H), 2.02-1.92 (m, 2H), 1.89-1.88 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 1.72 (bs, 6H), 1.41 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.85 (s, 4H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 176.5, 175.8, 175.4, 174.9, 173.7, 173.5, 172.7, 172.4, 172.3, 171.9, 171.8, 163.4, 160.6, 102.5, 90.7, 85.6, 83.0, 80.7, 75.1, 70.6, 58.7, 57.1, 56.3, 54.1, 51.7, 51.5, 51.3, 51.2, 51.1, 50.9, 46.7, 46.2, 42.4, 42.0, 39.9, 33.7, 33.0, 32.9, 31.8, 31.1, 30.3, 29.8, 29.1, 25.8, 25.0, 22.4, 19.3, 18.0, 17.1, 16.8, 16.1, 15.5 ppm.



**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(c-(2-hydroksyetyloamid))(d-(2-(2-hydroksyetoxy)-etyloamid))(8-OH)(OMe)<sub>5</sub> (279)**

Otrzymano według procedury 1: Spirolakton **263** (15 mg, 13  $\mu$ mol) i 2-(2-aminoetoksy)etanol (14  $\mu$ L, 0.13 mmol) mieszano w 1,4-dioksanie (1 mL) przez 16 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5-5%).

Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądanym diamid **279** otrzymano w postaci fioletowego proszku (11 mg, 71%).  $R_f = 0.33$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 10%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>58</sub>H<sub>83</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>16</sub>+H<sub>2</sub>O: C 56.85, H 6.99, N 9.15; otrzymano: C 56.64, H 6.93, N 8.92. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>58</sub>H<sub>83</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>16</sub> [M]<sup>+</sup> 1206.5253; otrzymano: 1206.5241. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 281 (8.16×10<sup>3</sup>), 318 (8.45×10<sup>3</sup>), 371 (2.46×10<sup>4</sup>), 552 (7.42×10<sup>3</sup>), 590 (7.42×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 7.25 (t,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 6.84 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 6.58 (bs, 1H), 5.77 (s, 1H), 3.8-3.7 (m, 5H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 6H), 3.61 (s, 3H), 3.59 (s, 1H), 3.55-3.54 (m, 2H), 3.50-3.45 (m, 6H), 3.27-3.21 (m, 1H), 3.19-3.15 (m, 2H), 3.08-3.06 (m, 1H), 2.81-2.78 (m, 1H), 2.65 (d,  $J = 3.7$  Hz, 3H), 2.57-2.41 (m, 8H), 2.34-2.29 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.19-2.16 (m, 2H), 2.13-2.11 (m, 2H), 2.10-2.04 (m, 6H), 1.66-1.62 (m, 11H), 1.44 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.36 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 176.6, 176.1, 174.6, 174.1, 173.1, 172.9, 172.1, 172.0, 171.9, 163.5, 159.8, 106.9, 102.8, 90.4, 85.8, 85.8, 83.1, 74.9, 73.0, 69.8, 61.7, 61.3, 58.8, 56.9, 56.6, 52.19, 52.11, 51.9, 51.4, 47.0, 46.4, 43.7, 42.8, 42.0, 40.0, 39.7, 33.9, 33.3, 32.6, 32.4, 31.0, 29.9, 25.7, 25.2, 22.0, 19.0, 18.2, 17.1, 17.0, 16.5, 15.6, 15.0 ppm.

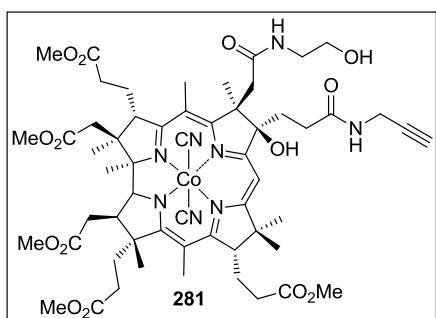
**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(c-(2-hydroksyetyloamid))(d-(6-azydoheksyloamid))(8-OH)(OMe)<sub>5</sub> (280)**

Otrzymano według procedury 1: Spirolakton **263** (14 mg, 13  $\mu$ mol) i 6-azydo-*n*-heksyloaminę (20 mg, 0.13 mmol) mieszano w 1,4-dioksanie (1 mL) przez 24 godziny. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5-5%).

Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądanym diamid **280** otrzymano w postaci fioletowego proszku (10 mg, 65%).  $R_f = 0.67$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 10%). Anal. elem.

obliczono dla  $C_{60}H_{86}CoN_{11}O_{14}+2H_2O$ : C 56.28, H 7.09, N 12.03; otrzymano: C 56.22, H 7.13, N 11.81. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $C_{60}H_{86}CoN_{11}O_{14} [M]^+$  1243.5682; otrzymano: 1243.5623. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $M^{-1}\times cm^{-1}$ ): 284 ( $8.92\times 10^3$ ), 321 ( $9.30\times 10^3$ ), 372 ( $2.76\times 10^4$ ), 553 ( $8.21\times 10^3$ ), 592 ( $1.04\times 10^4$ ) nm.  $^1H$  NMR (500 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 7.69 (bs, 1H), 7.52 (bs, 1H), 7.24 (bs, 1H), 6.10 (s, 1H), 3.95 (t,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 3.76 (dd,  $J = 6.3$  oraz 4.6 Hz, 1H), 3.52 (t,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.43 (s, 4H), 3.3-3.2 (m, 2H), 3.12 (m, 1H), 2.83-2.74 (m, 5H), 2.71-2.67 (m, 1H), 2.61-2.56 (m, 2H), 2.5-2.3 (m, 9H), 2.26 (s, 6H), 2.17 (s, 5H), 2.10-2.00 (m, 3H), 1.88 (bs, 3H), 1.67-1.62 (m, 2H), 1.38 (dd,  $J = 3.4$  oraz 4.8 Hz, 2H), 1.33 (s, 3H), 1.28-1.21 (m, 5H), 1.16 (s, 3H), 1.09-1.07 (m, 7H), 0.9-0.8 (m, 11H) ppm.  $^{13}C$  NMR (125 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 176.3, 176.1, 176.0, 175.3, 174.3, 173.5, 172.6, 172.3, 171.9, 171.8, 171.7, 163.5, 160.7, 102.4, 91.0, 86.4, 83.0, 74.9, 61.5, 58.6, 57.7, 54.3, 51.7, 51.43, 51.40, 51.3, 51.2, 46.3, 44.1, 43.8, 41.8, 39.8, 39.7, 33.7, 32.8, 32.5, 32.0, 31.6, 31.3, 29.6, 29.5, 28.9, 26.7, 26.6, 25.8, 25.1, 23.0, 22.2, 19.1, 17.9, 17.0, 16.4, 15.6, 15.3, 14.3 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*c*-(2-hydroksyetyloamid))(*d*-propargiloamid)(8-OH)(OMe)<sub>5</sub> (281)**



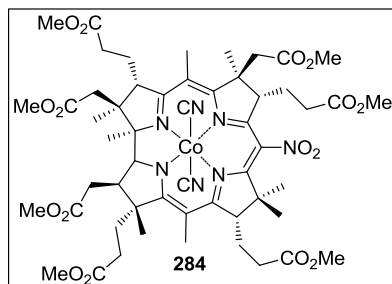
Otrzymano według procedury 1: Spirolakton **263** (15 mg, 13  $\mu$ mol) i propargiloaminę (7  $\mu$ L, 0.13 mmol) mieszano w 1,4-dioksanie (1 mL) przez 24 godziny. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2.5%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości

AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Požadany diamid **281** otrzymano w postaci fioletowego proszku (6 mg, 38%).  $R_f = 0.41$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla  $C_{57}H_{77}CoN_8O_{14}+2H_2O$ : C 57.70, H 6.93, N 9.28; otrzymano: C 57.85, H 6.85, N 9.28. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $C_{57}H_{77}CoN_8O_{14} [M]^+$  1156.4885; otrzymano: 1156.4877. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $M^{-1}\times cm^{-1}$ ): 276 ( $1.79\times 10^4$ ), 318 ( $9.34\times 10^3$ ), 372 ( $2.76\times 10^4$ ), 552 ( $7.99\times 10^3$ ), 590 ( $1.02\times 10^4$ ) nm.  $^1H$  NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 7.09 (t,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 6.84 (t,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 6.45 (bs, 1H), 5.76 (s, 1H), 3.99 (m, 2H), 3.8-3.7 (m, 6H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.58 (m, 1H), 3.46-3.40 (m, 2H), 3.19-3.18 (m, 2H), 3.08 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.64 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 2.6-2.4 (m, 6H), 2.34-2.29 (m, 2H), 2.26 (m, 3H), 2.20 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 2.17-2.14 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 1.9-1.7 (m, 2H), 1.66-1.62 (m, 8H), 1.45 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.27 (s, 4H), 1.19 (s, 3H), 0.89-0.84 (m, 1H) ppm.  $^{13}C$  NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 176.8, 176.6, 176.0, 174.5, 174.1, 174.0, 173.0, 172.9, 172.1, 172.0, 171.9, 163.2, 159.7, 106.9, 102.9, 90.1,

85.8, 83.2, 80.2, 80.2, 80.1, 75.0, 71.0, 61.4, 58.9, 56.9, 56.7, 52.6, 52.19, 52.12, 52.02, 52.00, 47.0, 46.4, 43.7, 42.8, 41.9, 39.7, 33.9, 33.1, 32.6, 32.2, 31.8, 31.7, 30.8, 30.0, 29.2, 25.5, 25.2, 22.2, 19.5, 18.3, 17.1, 16.9, 15.6, 15.5 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-NO<sub>2</sub>)(OMe)<sub>7</sub> (**284**)<sup>150</sup>**

**Związek znany, nowa metoda otrzymywania:**

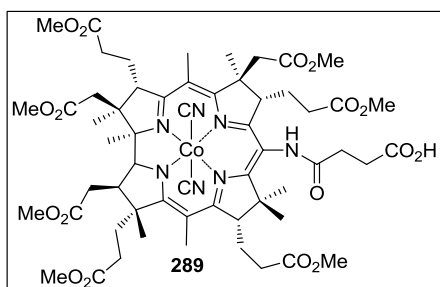


Do roztworu aminy **5** (25 mg, 23  $\mu$ mol) w MeCN (6 mL) wkroplono HNO<sub>3</sub> (1.2 mL, 65%), a następnie mieszano w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła przez 90 minut. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono DCM (20 mL) i wylano do wodnego roztworu NaHCO<sub>3</sub> (20 mL). Fazę organiczną przemywano wodnym roztworem NaHCO<sub>3</sub> do

uzyskania zasadowego odczynu fazy wodnej. Następnie, przemyto ją wodnym roztworem NaCN oraz solanką, osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalniki. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/EtOH, 0.5-3%) Główna frakcja zawierała nitrozwiązek **284**, którą po odparowaniu rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, a powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt **284** otrzymano w postaci czerwonego proszku (20 mg, 78%).  $R_f = 0.41$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). LRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>54</sub>H<sub>72</sub>CoN<sub>7</sub>NaO<sub>16</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1156.4; otrzymano: 1156.6.

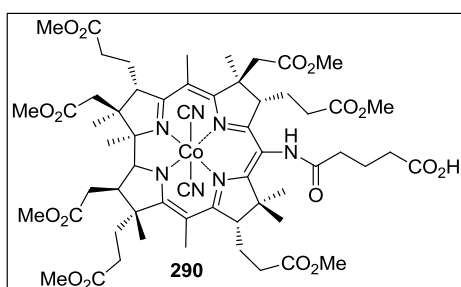
### 3. Otrzymywanie monoamidów z aminy **5**

Aminę **5** (25 mg, 23  $\mu$ mol) rozpuszczono w bezwodnym toluenie (0.5 mL) w atmosferze argonu, a następnie dodano DIPEA (0.1 mL, 0.55 mmol) oraz odpowiedni bezwodnik (0.57 mmol). Reakcję mieszano w temperaturze 50 °C bez dostępu światła przez wskazany, inny dla każdego bezwodnika, czas. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono DCM (15 mL) i przemyto wodnym roztworem NaCN (15 mL) oraz solanką. Fazę organiczną osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalnik. Otrzymano surową mieszaninę reakcyjną, którą oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym. Główna frakcja zawierała pożądany amid.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(3-karboksypropyloamid))(OMe)<sub>7</sub> (289)**

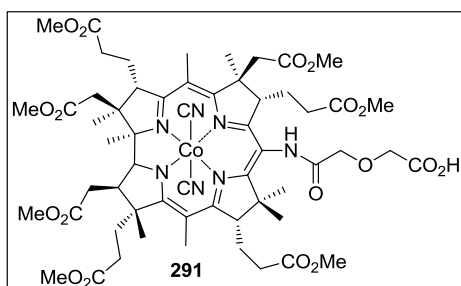
Otrzymano według procedury 3: Aminę **5** (15 mg, 14 μmol), DIPEA (59 μL, 0.34 mmol) oraz bezwodnik bursztynowy (34 mg, 0.34 mmol) mieszano w toluenie (0.3 mL) przez 24 godziny. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/MeOH, 5-15%). Otrzymany

produkt rozpuszczono w minimalnej ilości DCM i strącono *n*-heksanem, a powstały osad odwirowano i osuszono. *mezo*-Amid **289** otrzymano w postaci czerwono-fioletowego proszku (8.7 mg, 53%).  $R_f = 0.40$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 10%). HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>57</sub>H<sub>78</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>17</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1177.47500; otrzymano: 1177.4732. Ze względu na obecność w strukturze grupy karboksylowej analiza NMR nie była możliwa (zob. Badania własne str. 89).

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(4-karboksybutyloamid))(OMe)<sub>7</sub> (290)**

Otrzymano według procedury 3: Aminę **5** (25 mg, 23 μmol), DIPEA (96 μL, 0.55 mmol) oraz bezwodnik glutarowy (65 mg, 0.57 mmol) mieszano w toluenie (0.5 mL) przez 16 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/MeOH, 5-15%).

Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości DCM i strącono *n*-heksanem, a powstały osad odwirowano i osuszono. *mezo*-Amid **290** otrzymano w postaci czerwono-fioletowego proszku (13 mg, 45%).  $R_f = 0.62$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 15%). HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>58</sub>H<sub>80</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>17</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1191.49065; otrzymano: 1191.49248. Ze względu na obecność w strukturze grupy karboksylowej analiza NMR nie była możliwa (zob. Badania własne str. 89).

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(2-(karboksymetoksy)acetamid))(OMe)<sub>7</sub> (291)**

Otrzymano według procedury 3: Aminę **5** (25 mg, 23 μmol), DIPEA (96 μL, 0.55 mmol) oraz bezwodnik diglikolowy (66 mg, 0.57 mmol) mieszano w toluenie (0.5 mL) przez 30 minut. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej

DCVC (DCM/MeOH, 5-20%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości DCM i strącono *n*-heksanem, a powstały osad odwirowano i osuszono. *mezo*-Amid **291** otrzymano w postaci czerwono-fioletowego proszku (23 mg, 82%).  $R_f = 0.37$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 15%). HRMS ESI (*m/z*) obliczono dla C<sub>57</sub>H<sub>78</sub>CoN<sub>6</sub>NaO<sub>18</sub> [M-CN+Na]<sup>2+</sup> 608.22956; otrzymano: 608.2270. Ze względu na obecność w strukturze grupy karboksylowej analiza NMR nie była możliwa (zob. Badania własne str. 89).

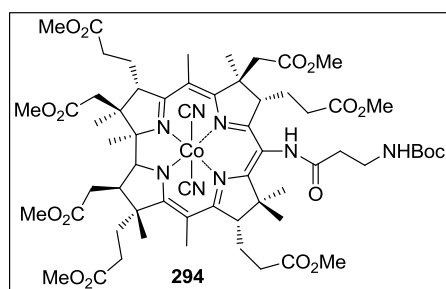
#### 4. Sprzężanie aminy **5** z kwasami karboksylowymi.

Aminę **5** (15 mg, 14 μmol), kwas karboksylowy (10 mg, 54 μmol), oraz odczynnik sprzęgający (54 μmol) rozpuszczono w bezwodnym DCM (0.5 mL). Reakcję prowadzono w ciemności, w atmosferze argonu, w temperaturze pokojowej przez kilka godzin (dokładny czas podany poniżej). Mieszaninę rozcieńczono DCM (25 mL) i przemyto wodnym roztworem NaCN (25 mL). Fazę organiczną osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym, *mezo*-amidy stanowiły główną frakcję.

#### 5. Otrzymywanie amidów z aminy **5** w reakcji Schottena-Baumann.

Kwas karboksylowy (0.06 mmol) rozpuszczono w bezwodnym DCM (1 mL) i dodano chlorek oksalilu (10 μL, 0.12 mmol). Następnie wkroplono DMF (10 μL) i mieszanie kontynuowano przez 40 min w temperaturze pokojowej, po czym zawartość lotną odparowano pod próżnią. Otrzymaną pozostałość rozpuszczono w bezwodnym DCM (1 mL) i dodano aminę **5** (14 μmol). Reakcję mieszano w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 10 minut, rozcieńczono DCM (10 mL) i wylano do wody (10 mL). Fazę organiczną przemyto wodnym roztworem NaHCO<sub>3</sub> oraz NaCN, osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym, *mezo*-amidy stanowiły główną frakcję.

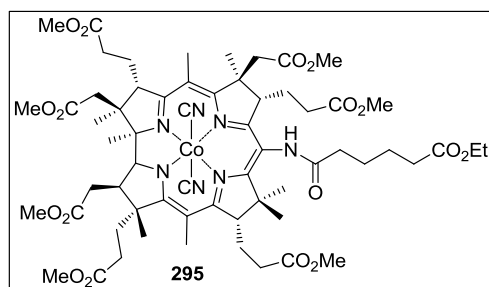
#### (CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(NHCO-β-Ala-NHBoc))(OMe)<sub>7</sub> (**294**)



Otrzymano według procedury **4**: Aminę **5** (61 mg, 55 μmol), *N*-Boc-β-alaninę (64 mg, 0.34 mmol), oraz EDC·HCl (37 mg, 0.19 mmol) rozpuszczono w DCM i mieszano w temperaturze 0 °C przez 3 godziny, a następnie w temperaturze pokojowej przez 17 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2-6%). Otrzymany produkt rozpuszczono

w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany *mezo*-amid **294** otrzymano w postaci fioletowego proszku (60 mg, 86%). t.t. 134-137 °C.  $R_f = 0.32$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>62</sub>H<sub>87</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>17</sub>+H<sub>2</sub>O: C 57.58, H 6.94, N 8.66; otrzymano: C 57.60, H 7.05, N 8.44. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>61</sub>H<sub>87</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>17</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1248.5485; otrzymano: 1248.5501. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 284 (9.42×10<sup>3</sup>), 310 (8.39×10<sup>3</sup>), 320 (8.85×10<sup>3</sup>), 372 (3.09×10<sup>4</sup>), 424 (2.86×10<sup>3</sup>), 557 (8.28×10<sup>3</sup>), 594 (9.52×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>)  $\delta$ : 8.39 (s, 1H), 6.28 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 3.98 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.67-3.58 (m, 2H), 3.56 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 2.94 (d,  $J = 17.2$  Hz, 1H), 2.85 (m, 1H), 2.8-2.6 (m, 6H), 2.6-2.5 (m, 2H), 2.50 (m, 2H), 2.5-2.2 (m, 8H), 2.19 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.06-1.99 (m, 1H), 1.95 (m, 2H), 1.85 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.56 (s, 3H), 1.50 (s, 9H), 1.46 (s, 3H), 1.42 (s, 3H), 1.37 (s, 1H), 1.20 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.13 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>)  $\delta$ : 176.1, 175.2, 174.6, 174.4, 174.3, 173.6, 173.3, 172.8, 172.5, 172.4, 172.3, 172.1, 164.4, 163.2, 156.5, 105.4, 105.0, 102.5, 83.1, 78.4, 74.7, 58.4, 57.0, 55.6, 52.9, 51.7, 51.6, 51.4, 51.3, 51.3, 51.2, 51.2, 48.3, 48.2, 46.0, 41.4, 41.3, 40.0, 37.4, 36.6, 33.6, 33.0, 31.6, 31.1, 30.5, 30.5, 29.9, 28.7, 28.1, 26.5, 26.1, 25.2, 22.3, 19.0, 17.8, 17.0, 16.2, 15.9 ppm.

#### (CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>Et))(OMe)<sub>7</sub> (**295**)

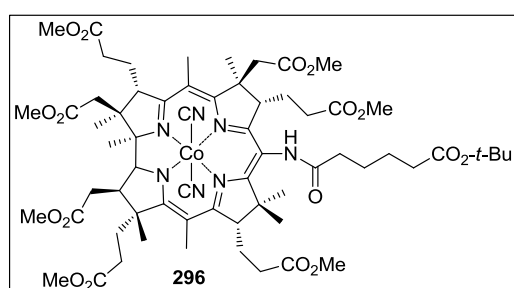


Otrzymano według procedury **5**: Do reakcji użyto wodoroadypinian etylu (11 mg, 0.06 mmol), chlorek oksalilu (10  $\mu$ L, 0.12 mmol), DMF (10  $\mu$ L) oraz aminę **5** (16 mg, 14  $\mu$ mol). Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 1-3%). Otrzymany

produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany *mezo*-amid **295** otrzymano w postaci fioletowego proszku (17 mg, 93%). t.t. 135-137 °C.  $R_f = 0.41$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>62</sub>H<sub>86</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>17</sub>+2H<sub>2</sub>O: C 57.44, H 7.00, N 7.56; otrzymano: C 57.33, H 7.10, N 7.68. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>61</sub>H<sub>86</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>17</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1233.5376; otrzymano: 1233.53204. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 285 (9.84×10<sup>3</sup>), 310 (9.00×10<sup>3</sup>), 320 (9.46×10<sup>3</sup>), 372 (3.37×10<sup>4</sup>), 425 (2.95×10<sup>3</sup>), 558 (8.81×10<sup>3</sup>), 596 (1.06×10<sup>4</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 7.34 (s, 1H), 4.11 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.81 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H), 3.76-3.71 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.50 (t,  $J = 5.9$  Hz,

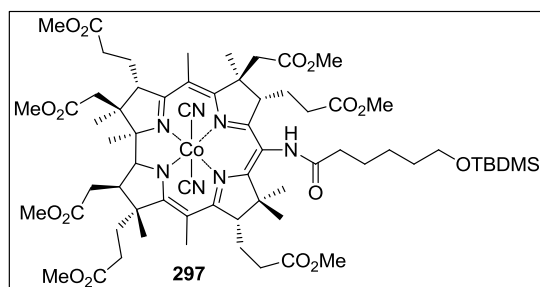
1H), 2.97 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.7-2.5 (m, 8H), 2.5-2.3 (m, 7H), 2.22 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.3-2.0 (m, 5H), 1.85 (m, 1H), 1.8-1.6 (m, 5H), 1.75 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.24 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.10 (s, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 176.1, 175.8, 175.2, 174.7, 174.3, 173.9, 173.8, 173.6, 173.3, 173.2, 172.4, 172.3, 171.7, 164.1, 163.4, 105.8, 104.5, 103.1, 83.2, 75.1, 60.7, 58.8, 57.3, 55.7, 54.0, 53.0, 52.7, 52.4, 52.3, 52.2, 52.1, 52.0, 51.8, 48.8, 48.5, 46.0, 41.7, 41.5, 39.8, 36.3, 34.5, 34.1, 33.0, 32.2, 31.8, 30.9, 30.2, 30.0, 26.9, 26.1, 25.4, 25.3, 25.0, 22.5, 19.3, 18.5, 17.2, 16.5, 16.1, 14.6 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>-*t*-Bu))(OMe)<sub>7</sub> (296)**



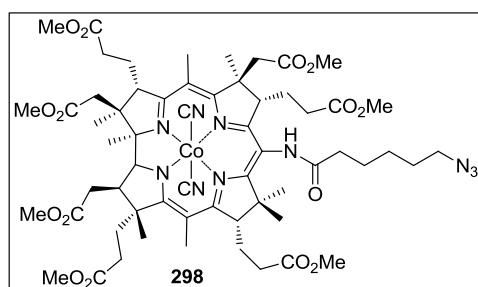
Otrzymano według procedury **5**: Do reakcji użyto wodoroadypinian *tert*-butylu (12 mg, 0.06 mmol), chlorek oksalilu (10  $\mu\text{L}$ , 0.12 mmol), DMF (10  $\mu\text{L}$ ) oraz aminę **5** (16 mg, 14  $\mu\text{mol}$ ). Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 1-3%).

Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt **296** otrzymano w postaci fioletowego proszku (18 mg, 99%).  $R_f = 0.30$  ( $\text{SiO}_2$ , DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla  $\text{C}_{64}\text{H}_{90}\text{CoN}_7\text{O}_{17}$ : C 59.66, H 7.04, N 7.61; otrzymano: C 59.78, H 7.01, N 7.35. LRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $\text{C}_{63}\text{H}_{90}\text{CoN}_6\text{O}_{17} [\text{M}-\text{CN}]^+$  1261.6; otrzymano: 1261.6, profil izotopowy zgodny z teoretycznym. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$ ): 284 ( $9.54\times 10^3$ ), 310 ( $8.49\times 10^3$ ), 320 ( $8.89\times 10^3$ ), 373 ( $3.13\times 10^4$ ), 425 ( $2.85\times 10^3$ ), 558 ( $8.16\times 10^3$ ), 596 ( $9.87\times 10^3$ ) nm.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 7.32 (s, 1H), 3.82 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H), 3.77-3.71 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 6H), 3.67 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.49 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H), 2.96 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 2.79 (m, 1H), 2.7-2.5 (m, 9H), 2.5-2.0 (m, 14H), 2.22 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.84 (m, 1H), 1.8-1.6 (m, 6H), 1.57 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.36 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.10 (s, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 176.0, 175.8, 175.1, 174.7, 174.2, 173.8, 173.6, 173.3, 173.2, 173.1, 172.4, 172.3, 171.7, 164.1, 163.4, 105.8, 104.5, 103.1, 83.2, 80.3, 75.1, 58.7, 57.3, 55.7, 54.0, 52.9, 52.7, 52.4, 52.3, 52.2, 52.1, 51.9, 51.8, 48.7, 48.5, 46.0, 41.6, 41.5, 39.8, 36.3, 35.8, 34.1, 33.0, 32.2, 31.8, 30.9, 30.2, 30.0, 28.4, 28.3, 26.9, 26.1, 25.5, 25.4, 25.0, 22.4, 19.3, 18.5, 17.2, 16.5, 16.1 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-OTBDMS))(OMe)<sub>7</sub> (297)**

Otrzymano według procedury **5**: Do reakcji użyto kwas 6-((*tert*-butylo-dimetylosilil)oksy)heksanowy (57 mg, 0.23 mmol), chlorek oksalilu (40  $\mu$ L, 0.47 mmol), DMF (40  $\mu$ L) oraz aminę **5** (60 mg, 54  $\mu$ mol). Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej

DCVC (DCM/EtOH, 0.5-3%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt **297** otrzymano w postaci fioletowego proszku (62 mg, 86%).  $R_f = 0.36$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>66</sub>H<sub>98</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>16</sub>Si+H<sub>2</sub>O: C 58.69, H 7.41, N 7.36; otrzymano: C 58.67, H 7.32, N 7.20. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>65</sub>H<sub>98</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>16</sub>Si [M-CN]<sup>+</sup> 1305.61351; otrzymano: 1305.61670. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 284 (9.60×10<sup>3</sup>), 310 (8.67×10<sup>3</sup>), 320 (9.02×10<sup>3</sup>), 372 (3.11×10<sup>4</sup>), 425 (2.99×10<sup>3</sup>), 558 (8.20×10<sup>3</sup>), 596 (9.72×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.09 (s, 1H), 3.69 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.64-3.60 (m, 2H), 3.56 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.52-3.49 (m, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.29 (s, 1H), 3.25 (t,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 3.04 (t,  $J = 4.7$  Hz, 1H), 2.81 (dd,  $J = 17.8, 8.5$  Hz, 1H), 2.65-2.53 (m, 4H), 2.5-1.9 (m, 16H), 2.18 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.87 (m, 1H), 1.73 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.59-1.47 (m, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.38-1.31 (m, 2H), 1.33 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.04 (s, 6H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 175.6, 174.8, 173.9, 173.8, 173.5, 173.2, 172.8, 172.7, 172.0, 171.1, 164.0, 162.5, 129.6, 128.1, 104.5, 104.3, 102.0, 82.6, 74.0, 62.8, 57.8, 56.3, 54.2, 52.4, 52.1, 52.0, 51.8, 51.7, 51.6, 51.3, 47.8, 47.2, 45.7, 41.7, 41.0, 35.5, 33.3, 32.6, 31.7, 31.0, 30.8, 30.6, 30.2, 29.5, 26.3, 25.9, 25.8, 25.5, 24.9, 24.8, 22.0, 18.5, 18.4, 17.6, 16.7, 15.9, 15.6, -4.8 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-N<sub>3</sub>))(OMe)<sub>7</sub> (298)**

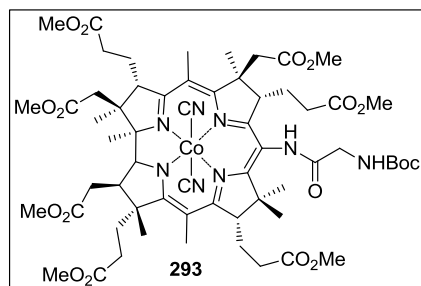
Otrzymano według procedury **5**: Do reakcji użyto kwas 6-azydoheksanowy (10 mg, 0.06 mmol), chlorek oksalilu (10  $\mu$ L, 0.12 mmol), DMF (10  $\mu$ L) oraz aminę **5** (16 mg, 14  $\mu$ mol). Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 0.5-2%).

Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem,



powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany *mezo*-amid **298** otrzymano w postaci fioletowego proszku (18 mg, 99%).  $R_f = 0.45$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>60</sub>H<sub>83</sub>CoN<sub>10</sub>O<sub>15</sub>+2H<sub>2</sub>O: C 56.33, H 6.85, N 10.95; otrzymano: C 56.53, H 6.93, N 10.83. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>59</sub>H<sub>83</sub>CoN<sub>9</sub>O<sub>15</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1216.53351; otrzymano: 1216.53035. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 285 (9.69×10<sup>3</sup>), 310 (8.95×10<sup>3</sup>), 320 (9.33×10<sup>3</sup>), 372 (3.27×10<sup>4</sup>), 424 (3.09×10<sup>3</sup>), 558 (8.54×10<sup>3</sup>), 596 (1.03×10<sup>4</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 7.28 (s, 1H), 3.82 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H), 3.8-3.7 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.69 (s, 6H), 3.68 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.50 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 3.31 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.97 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 2.79 (m, 1H), 2.7-2.5 (m, 9H), 2.45-2.25 (m, 7H), 2.22 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.25-2.00 (m, 5H), 1.84 (m, 3H), 1.75 (m, 3H), 1.65 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.10 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 176.1, 175.8, 175.2, 174.6, 174.2, 173.8, 173.7, 173.3, 173.2, 172.4, 172.3, 171.7, 164.0, 163.4, 105.8, 104.5, 103.2, 83.2, 75.1, 58.8, 57.3, 55.7, 54.0, 53.0, 52.7, 52.4, 52.3, 52.2, 52.1, 51.9, 51.9, 51.7, 48.7, 48.5, 46.0, 41.6, 41.5, 39.8, 36.4, 34.1, 33.0, 32.2, 31.8, 30.9, 30.2, 30.0, 29.3, 27.2, 26.9, 26.1, 25.4, 25.1, 22.5, 19.3, 18.5, 17.2, 16.5, 16.1 ppm.

#### (CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(NHCO-Gly-NHBoc))(OMe)<sub>7</sub> (**293**)

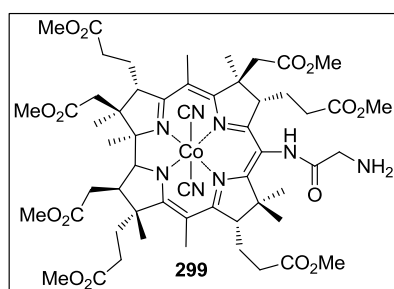


Otrzymano według procedury 4: Aminę **5** (15 mg, 14  $\mu$ mol), *N*-Boc-glicynę (17 mg, 82  $\mu$ mol), oraz DCC (11 mg, 54  $\mu$ mol) rozpuszczono w DCM i mieszano w temperaturze 0 °C przez 3 godziny, a następnie w temperaturze pokojowej przez 17 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii

kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2-6%). Otrzymany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany *mezo*-amid **293** otrzymano w postaci fioletowego proszku (14 mg, 77%). t.t. 129-131 °C.  $R_f = 0.34$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>61</sub>H<sub>85</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>17</sub>+3H<sub>2</sub>O: C 55.70, H 6.97, N 8.52; otrzymano: C 55.55, H 6.92, N 8.57. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>60</sub>H<sub>85</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>17</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1234.53285; otrzymano: 1234.5331. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 284 (1.01×10<sup>4</sup>), 310 (8.91×10<sup>3</sup>), 320 (9.45×10<sup>3</sup>), 372 (3.40×10<sup>4</sup>), 425 (3.02×10<sup>3</sup>), 558 (8.83×10<sup>3</sup>), 595 (1.05×10<sup>4</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$ : 7.81 (s, 1H), 5.51 (s, 1H), 3.99 (dd,  $J = 6.4$  oraz 17.2 Hz, 1H), 3.87-3.79 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.54 (t,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 2.97

(t,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.7-2.6 (m, 3H), 2.61-2.58 (m, 1H), 2.58-2.46 (m, 4H), 2.46-2.35 (m, 3H), 2.34-2.26 (m, 1H), 2.26-2.13 (m, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.13-2.08 (m, 1H), 2.08-1.94 (m, 2H), 1.9-1.8 (m, 1H), 1.8-1.7 (m, 2H), 1.76 (s, 2H), 1.57 (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 12H), 1.36 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.11 (s, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 175.7, 175.5, 174.9, 174.2, 173.8, 172.9, 172.8, 172.0, 171.9, 171.5, 170.7, 163.3, 163.1, 105.7, 103.1, 102.9, 82.9, 80.1, 74.7, 58.4, 56.8, 55.3, 52.4, 52.3, 52.1, 51.9, 51.8, 51.7, 51.6, 51.5, 48.5, 48.5, 45.7, 44.6, 41.3, 41.1, 39.4, 33.7, 32.6, 31.8, 31.5, 30.6, 29.8, 29.7, 28.2, 26.7, 25.7, 25.0, 22.1, 21.8, 19.0, 18.1, 16.8, 16.1, 15.7 ppm.

### (CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(NHCO-Gly-NH<sub>2</sub>))(OMe)<sub>7</sub> (**299**)

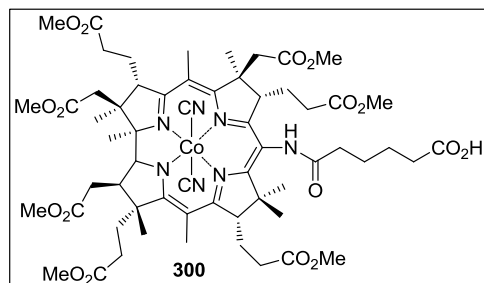


W atmosferze argonu *mezo*-amid **293** (14 mg, 11  $\mu\text{mol}$ ) oraz  $\text{Et}_3\text{SiH}$  (3  $\mu\text{L}$ , 18  $\mu\text{mol}$ ) rozpuszczono w bezwodnym DCM (0.5 mL), a następnie wkroplono TFA (0.5 mL). Reakcję mieszano w temperaturze pokojowej przez 90 minut bez dostępu światła. Po rozcieńczeniu DCM (20 mL) mieszaninę reakcyjną wylano do wodnego roztworu  $\text{NaHCO}_3$  (40 mL).

Produkt ekstrahowano DCM (2 $\times$ 20 mL), a połączone fazy organiczne przemyto wodnym roztworem  $\text{NaCN}$ . Fazę organiczną osuszono bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , odsączono i odparowano rozpuszczalniki. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/EtOH, 10-15%), główna frakcja zawierała produkt. Otrzymany *mezo*-amid **299** rozpuszczono w minimalnej ilości  $\text{AcOEt}$  i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt **299** otrzymano w postaci czerwono-fioletowego proszku (13 mg, 99%). t.t. 119-122  $^\circ\text{C}$ .  $R_f = 0.37$  ( $\text{SiO}_2$ , DCM/EtOH, 15%). Anal. elem. obliczono dla  $\text{C}_{56}\text{H}_{77}\text{CoN}_8\text{O}_{15} + 2\text{H}_2\text{O}$ : C 56.18, H 6.82, N 9.36; otrzymano: C 55.96, H 6.77, N 9.28. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $\text{C}_{55}\text{H}_{77}\text{CoN}_7\text{O}_{15}\text{Na} [\text{M}-\text{CN}]^+$  1134.48042; otrzymano: 1134.4860. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$ ): 285 ( $1.34\times 10^4$ ), 310 ( $1.18\times 10^4$ ), 320 ( $1.24\times 10^4$ ), 373 ( $4.42\times 10^4$ ), 425 ( $3.90\times 10^3$ ), 560 ( $1.17\times 10^4$ ), 597 ( $1.38\times 10^4$ ) nm.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 8.67 (s, 1H), 3.81 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.55 (m, 1H), 3.44 (s, 2H), 2.96 (t,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.7-2.6 (m, 3H), 2.6-2.5 (m, 6H), 2.41 (m, 2H), 2.34-2.26 (m, 2H), 2.26-2.14 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.14-2.00 (m, 4H), 1.9-1.7 (m, 6H), 1.57 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.10 (s, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 175.6, 174.2, 174.1, 173.4, 173.1, 173.0, 172.2, 172.1, 171.6, 164.0, 163.3, 105.5, 103.8, 102.9, 83.1, 74.9, 58.6, 57.1, 55.5, 52.8, 52.6, 52.1, 52.07,

52.01, 51.9, 51.8, 51.6, 48.6, 48.3, 45.9, 45.3, 41.6, 39.7, 34.0, 32.8, 32.0, 31.3, 30.8, 30.0, 26.5, 25.9, 25.3, 22.3, 19.2, 18.3, 17.0 ppm.

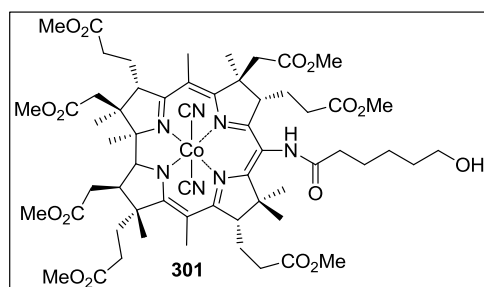
**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>H))(OMe)<sub>7</sub> (300)**



W atmosferze argonu, *mezo*-amid **296** (15 mg, 11  $\mu$ mol) oraz Et<sub>3</sub>SiH (3  $\mu$ L, 18  $\mu$ mol) rozpuszczono w bezwodnym DCM (0.5 mL) i wkroplono TFA (0.5 mL). Reakcję mieszano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez godzinę, a następnie rozcieńczono DCM (20 mL) i wylano do

wodnego roztworu NaHCO<sub>3</sub> (40 mL). Produkt ekstrahowano DCM (2×20 mL), połączone fazy organiczne przemyto wodnym roztworem NaCN. Fazę organiczną osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalnik. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 5-20%), główna frakcja zawierała produkt. Otrzymany *mezo*-amid **300** rozpuszczono w minimalnej ilości DCM i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany produkt **300** otrzymano w postaci czerwonego proszku (5 mg, 37%). R<sub>f</sub> = 0.48 (SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 10%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>60</sub>H<sub>82</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>17</sub>+3H<sub>2</sub>O: C 56.02, H 6.90, N 7.62; otrzymano: C 56.10, H 6.88, N 7.62. HRMS ESI (*m/z*) obliczono dla C<sub>59</sub>H<sub>82</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>17</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1205.50629; otrzymano: 1205.50826. Ze względu na obecność w strukturze grupy karboksylowej analiza NMR nie była możliwa (zob. Badania własne str. 89).

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-(NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-OH))(OMe)<sub>7</sub> (301)**

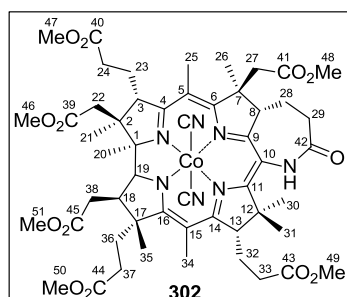


W atmosferze argonu *mezo*-amid **297** (21 mg, 16  $\mu$ mol) rozpuszczono w bezwodnym THF (0.3 mL) i wkroplono roztwór TBAF (53  $\mu$ L, 1M). Reakcję mieszano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez 6 godzin, a następnie rozcieńczono DCM (20 mL) i przemyto wodą (20 mL) oraz

wodnym roztworem NaCN. Fazę organiczną osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalnik. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/MeOH, 3-10%), główna frakcja zawierała produkt. Otrzymany *mezo*-amid **301** rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany produkt **301**

otrzymano w postaci czerwonego proszku (13 mg, 67%).  $R_f = 0.43$  ( $\text{SiO}_2$ , DCM/MeOH, 7%). Anal. elem. obliczono dla  $\text{C}_{60}\text{H}_{84}\text{CoN}_7\text{O}_{16} + \text{H}_2\text{O}$ : C 58.29, H 7.01, N 7.93; otrzymano: C 58.24, H 7.30, N 8.11. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $\text{C}_{60}\text{H}_{84}\text{CoN}_7\text{O}_{16}\text{Na} [\text{M} + \text{Na}]^+$  1240.51988; otrzymano: 1240.51985. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ): 285 ( $8.81 \times 10^3$ ), 310 ( $8.16 \times 10^3$ ), 320 ( $8.64 \times 10^3$ ), 372 ( $3.26 \times 10^4$ ), 425 ( $2.45 \times 10^3$ ), 453 ( $1.37 \times 10^3$ ), 457 ( $1.41 \times 10^3$ ), 557 ( $8.37 \times 10^3$ ), 595 ( $1.03 \times 10^4$ ) nm.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 9.09 (s, 1H), 4.35 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 3.72-3.64 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.56 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.53-3.48 (m, 1H), 3.42 (dd,  $J = 11.9, 6.6$  Hz, 2H), 3.25 (t,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 3.04 (t,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 2.81 (dd,  $J = 17.8, 8.5$  Hz, 1H), 2.7-2.5 (m, 4H), 2.5-1.9 (m, 15H), 2.18 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.88 (m, 1H), 1.74 (m, 3H), 1.61-1.51 (m, 2H), 1.56 (s, 3H), 1.50-1.41 (m, 2H), 1.44 (s, 3H), 1.38-1.29 (m, 2H), 1.33 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 0.95 (s, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 175.2, 174.4, 173.6, 173.4, 173.1, 172.8, 172.5, 172.4, 172.3, 171.5, 170.7, 163.6, 162.1, 129.2, 127.7, 104.0, 103.9, 101.5, 82.1, 73.5, 62.7, 60.5, 57.4, 55.8, 53.7, 52.0, 51.9, 51.7, 51.6, 51.4, 51.3, 51.2, 50.9, 47.3, 46.7, 45.3, 41.2, 40.6, 39.5, 35.1, 32.9, 32.4, 31.3, 30.5, 30.3, 30.2, 29.7, 29.0, 25.4, 25.3, 24.6, 24.3, 21.5, 18.1, 17.1, 16.2, 15.4, 15.1 ppm.

### (CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-NH-*d*-laktam)(OMe)<sub>6</sub> (**302**)



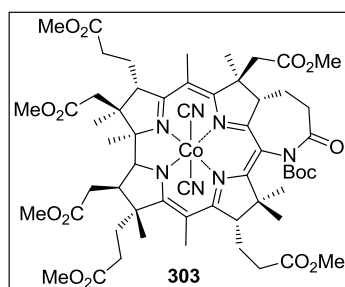
Aminę **5** (145 mg, 0.13 mmol) rozpuszczono w DCM (13 mL), a następnie wkroplono TFA (41  $\mu\text{L}$ , 0.53 mmol). Reakcję mieszano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez 5 godzin, rozcieńczono DCM i wylano do wodnego roztworu  $\text{NaHCO}_3$ . Fazę organiczną przemyto wodnym roztworem  $\text{NaCN}$  i solanką, osuszono bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , odsączono i odparowano rozpuszczalnik. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/EtOH, 2-5%), główna frakcja zawierała produkt. Otrzymany osad rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaný produkt **302** otrzymano w postaci niebieskofioletowego proszku (116 mg, 82%). t.t. 151-155 °C.  $R_f = 0.30$  ( $\text{SiO}_2$ , DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla  $\text{C}_{53}\text{H}_{70}\text{CoN}_7\text{O}_{13} + 3\text{H}_2\text{O}$ : C 56.53, H 6.80, N 8.71; otrzymano: C 56.66, H 6.90, N 8.58. LRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $\text{C}_{52}\text{H}_{70}\text{CoN}_6\text{O}_{13} [\text{M} - \text{CN}]^+$  1045.4; otrzymano 1045.5. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ): 294 ( $9.80 \times 10^3$ ), 309 ( $8.77 \times 10^3$ ), 320 ( $8.54 \times 10^3$ ), 373 ( $2.99 \times 10^4$ ), 564 ( $7.81 \times 10^3$ ), 603 ( $9.08 \times 10^3$ ) nm.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 8.03 (s, 1H), 3.96 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 3.90-3.84 (m, 2H), 3.50

(s, 3H), 3.45 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.32 (s, 3H), 2.9-2.8 (m, 2H), 2.8-2.6 (m, 3H), 2.6-2.4 (m, 4H), 2.4-2.3 (m, 5H), 2.3-2.1 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.05-1.93 (m, 3H), 1.84 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.56-1.44 (m, 3H), 1.42 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.03 (s, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, toluen- $d_8$ )  $\delta$ : 175.2, 175.1, 174.2, 173.8, 172.7, 172.4, 172.2, 171.9, 171.6, 170.8, 170.6, 164.2, 163.8, 106.5, 105.5, 103.4, 82.9, 75.3, 58.6, 57.5, 55.6, 52.7, 52.0, 51.7, 51.4, 51.3, 51.2, 51.1, 48.2, 46.5, 45.9, 43.7, 41.3, 39.8, 33.9, 33.1, 31.9, 31.3, 30.7, 30.0, 29.6, 27.1, 26.0, 24.8, 22.5, 21.5, 19.1, 18.4, 16.8, 16.0, 15.9 ppm.

Tabela 20. Tabela zaobserwowanych sprzężeń w widmach dwuwymiarowych laktamu **302**.

Przypisanie	$^{13}\text{C}$ NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje		Przypisanie	$^{13}\text{C}$ NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje	
		HSQC [ppm]	HMBC			HSQC [ppm]	HMBC
C16	175.20		C35, C34	O-CH <sub>3</sub>	51.27	3.45	
C4	175.18		C25	O-CH <sub>3</sub>	51.07	3.35	
C42, C=O	174.2		C29, C28*	C12	48.2		C30, C13
C=O	173.8			C7	46.5		C26, C27, C8
C=O	172.7			C2	45.9		C21, C20, C22, C3, C19, C28
C=O	172.4			C27	43.7	2.52	C26, C8
C=O	172.2			C22	41.3	2.31 oraz 2.80	C21, C3
C=O	171.9			C18	39.8	2.84	C35, C20, C19
C11	171.6		C30, C31, C13	C24	33.9	2.43-2.56	C23, C3
C9	170.8		C8,		33.1		
C=O	170.6			C38	31.9	2.41	C18, C19, C35
C6	164.2		C26, C25, C27, C8	C29	31.3	2.14 oraz 2.67	C28*
C14	163.8		C13		30.8		
C10	106.5				30.0		
C5	105.5		C25	C30	29.6	1.14	C31, C13
C15	103.4		C34	C28	27.1	1.48 oraz 1.98	C8, C26, C29
C1	82.9		C20; C21; C22*; C3; C19		26.0		
C19	75.3	3.96	C20, C18	C23	24.8	1.98	C24, C3
C17	58.6		C35, C38, C18	C20	22.5	1.41	C19
C3	57.5	3.86	C21, C22, C28, C29	C31	21.5	1.42	C30
C13	55.6	2.83	C30, C31	C26	19.1	1.21	C27
C8	52.8	3.87	C26, C27	C35	18.4	1.03	C18
O-CH <sub>3</sub>	51.99	3.50		C21	16.8	1.16	C22*
O-CH <sub>3</sub>	51.71	3.39		C34	15.99	2.17	
O-CH <sub>3</sub>	51.37	3.41		C25	15.95	2.10	
O-CH <sub>3</sub>	51.33	3.32					

\*Zaobserwowano sprzężenie tylko z jednym z diastereotopowych protonów.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(10-NBoc-*d*-laktam)(OMe)<sub>6</sub> (303)**

Laktam **302** (24 mg, 22  $\mu$ mol), Boc<sub>2</sub>O (46 mg, 0.21 mmol) oraz DMAP (5.0 mg, 39  $\mu$ mol) rozpuszczono w bezwodnym DCM w atmosferze argonu. Reakcję mieszało przez 23 godziny w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Rozcieńczono DCM (50 mL) i przemyto wodnym roztworem NaCN (25 mL).

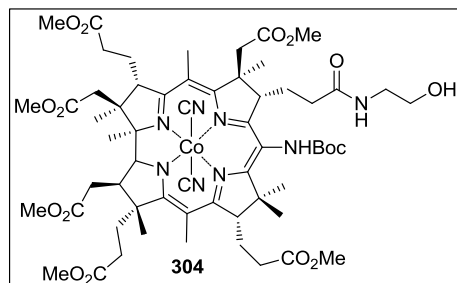
Fazę organiczną osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalnik. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/EtOH, 1-1.5%), główna frakcja zawierała produkt. Wyizolowany laktam **303** rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany produkt **303** otrzymano w postaci fioletowego proszku (14 mg, 73%). t.t. 141-144 °C.  $R_f$  = 0.38 (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>58</sub>H<sub>78</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>15</sub>: C 59.43, H 6.71, N 8.36; otrzymano: C 59.33, H 6.60, N 8.11. LRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>57</sub>H<sub>78</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>15</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1145.5; otrzymano 1145.5, profil izotopowy zgodny. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 287 (9.64×10<sup>3</sup>), 309 (8.32×10<sup>3</sup>), 320 (8.81×10<sup>3</sup>), 371 (3.03×10<sup>4</sup>), 420 (2.54×10<sup>3</sup>), 554 (8.27×10<sup>3</sup>), 592 (9.44×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3.87 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H), 3.81 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.05 (m, 1H), 2.9-2.8 (m, 2H), 2.77 (m, 1H), 2.7-2.4 (m, 9H), 2.4-2.3 (m, 2H), 2.3-2.2 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.16-2.04 (m, 3H), 1.81-1.75 (m, 1H), 1.74 (s, 2H), 1.7-1.6 (m, 2H), 1.54 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.43 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.27 (s, 6H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 175.8, 175.3, 173.9, 173.1, 172.83, 172.78, 172.2, 172.0, 171.8, 170.4, 168.8, 163.81, 163.77, 150.3, 108.1, 105.8, 104.4, 84.6, 82.7, 75.5, 59.0, 57.3, 55.9, 52.6, 52.04, 52.01, 51.96, 51.9, 51.8, 51.4, 49.0, 46.4, 45.5, 42.9, 40.6, 39.3, 34.2, 33.8, 32.8, 32.1, 30.9, 30.0, 29.0, 28.0, 26.1, 25.6, 24.6, 22.4, 21.2, 19.2, 18.2, 16.9, 16.0 ppm.

**6. Otwieranie laktamu 303 aminami.**

Laktam **303** (124 mg, 0.11 mmol), NaCN (31 mg, 0.63 mmol), TEA (0.24 mL, 1.72 mmol) oraz odpowiednią aminę (1.1 mmol) zmieszano w DMF (2.5 mL) w atmosferze argonu. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła przez określony poniżej czas. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono DCM (50 mL) i przemyto kolejno wodą (20 mL) oraz wodnym roztworem NaCN (20 mL). Fazę organiczną osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalnik. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono

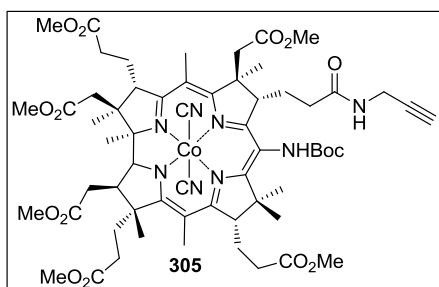
metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym, główna frakcja zawierała pożądany produkt.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*d*-(2-hydroksyetyloamid))(10-NHBoc)(OMe)<sub>6</sub> (304)**



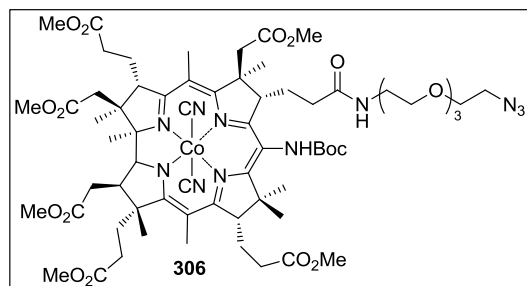
Otrzymano według procedury 6: Laktam **303** (124 mg, 0.11 mmol), NaCN (31 mg, 0.63 mmol), TEA (0.24 mL, 1.72 mmol) i etanoloaminę (64  $\mu$ L, 1.1 mmol) rozpuszczono w DMF (2.5 mL) i mieszano przez 16 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej

DCVC (DCM/EtOH, 1.5-3.5%). Wyizolowany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany *d*-amid **304** otrzymano w postaci fioletowego proszku (111 mg, 85%). t.t. 169-173 °C.  $R_f$  = 0.43 (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 10%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>60</sub>H<sub>85</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>16</sub>: C 58.43, H 6.95, N 9.09; otrzymano: C 58.25, H 6.87, N 8.78. LRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>59</sub>H<sub>85</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>16</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1206.5; otrzymano 1206.6, profil izotopowy zgodny z teoretycznym. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 285 (8.77×10<sup>3</sup>), 309 (8.12×10<sup>3</sup>), 319 (8.38×10<sup>3</sup>), 372 (3.13×10<sup>4</sup>), 425 (2.71×10<sup>3</sup>), 557 (8.06×10<sup>3</sup>), 594 (9.46×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.20 (s, 0.8H), 7.89 (s, 0.2H), 7.13 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 0.8H), 7.11-7.02 (m, 0.2H), 4.53 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H), 4.44 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 4.39 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 3.71 (d,  $J$  = 10.5 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.59-3.45 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.38 (m, 1H), 3.3-3.2 (m, 2H), 3.18-3.12 (m, 1H), 3.1-3.0 (m, 2H), 2.79 (m, 1H), 2.66-2.54 (m, 3H), 2.5-2.2 (m, 7H), 2.2-2.1 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.1-1.8 (m, 5H), 1.8-1.6 (m, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.42 (s, 7H), 1.32 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.26 (s, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.10-1.06 (m, 1H), 1.00 (s, 3H), 0.99 (s, 1H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 175.2, 174.64, 174.60, 173.5, 173.3, 172.4, 172.34, 172.31, 172.1, 171.6, 170.5, 163.8, 162.2, 155.4, 104.2, 103.9, 101.6, 82.2, 78.3, 73.7, 67.23, 67.16, 59.8, 57.5, 56.0, 53.8, 52.5, 52.0, 51.7, 51.6, 51.4, 51.2, 50.9, 47.9, 47.4, 46.6, 45.1, 41.3, 41.1, 40.7, 33.0, 32.0, 30.6, 30.1, 29.2, 28.2, 27.8, 26.3, 25.2, 24.3, 21.6, 21.2, 20.0, 18.2, 17.3, 16.2, 15.5, 15.0 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*d*-propargiloamid)(10-NHBoc)(OMe)<sub>6</sub> (305)**

Otrzymano według procedury 6: Laktam **303** (32 mg, 0.03 mmol), NaCN (8 mg, 0.16 mmol), TEA (61  $\mu$ L, 0.44 mmol), propargiloaminę (18  $\mu$ L, 0.28 mmol) rozpuszczono w DMF (0.6 mL) i mieszano przez 32 godziny. Mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH,

1.5-3.5%). Wyizolowany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądaną *d*-amid **305** otrzymano w postaci fioletowego proszku (23 mg, 68%). t.t. 133-136 °C.  $R_f = 0.37$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>61</sub>H<sub>83</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>15</sub>+3H<sub>2</sub>O: C 57.18, H 7.00, N 8.75; otrzymano: C 57.12, H 7.01, N 8.54. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>61</sub>H<sub>83</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>15</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 1249.52021; otrzymano: 1249.51754. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 285 (8.95×10<sup>3</sup>), 309 (8.12×10<sup>3</sup>), 319 (8.36×10<sup>3</sup>), 372 (3.12×10<sup>4</sup>), 424 (2.78×10<sup>3</sup>), 555 (8.12×10<sup>3</sup>), 593 (9.74×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.19 (s, 0.8H), 7.88 (s, 0.2H), 7.53 (t,  $J = 5.1$  Hz, 0.8H), 7.43 (t,  $J = 5.1$  Hz, 0.2H), 4.45 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 4.39 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.74-3.70 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.6-3.4 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.39 (t,  $J = 4.7$  Hz, 1H), 3.25 (m, 0.5H), 3.16 (m, 0.5H), 3.04 (m, 2H), 2.81 (m, 1H), 2.74-2.56 (m, 4H), 2.48-2.24 (m, 6H), 2.23-2.09 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.07-1.98 (m, 1H), 1.98-1.88 (m, 3H), 1.84-1.63 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.42 (s, 8H), 1.32 (s, 3H), 1.30-1.23 (m, 1H), 1.28 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.10-1.06 (m, 0.5H), 1.00 (s, 3H), 0.99 (s, 0.5H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 175.2, 174.6, 174.5, 173.5, 173.3, 172.4, 172.34, 172.30, 171.7, 171.6, 163.8, 162.2, 155.3, 104.2, 104.0, 101.6, 82.2, 81.1, 78.3, 73.7, 72.9, 67.23, 67.16, 57.5, 56.0, 53.8, 52.4, 52.0, 51.7, 51.6, 51.4, 51.2, 50.9, 47.4, 46.5, 45.1, 41.1, 40.7, 33.0, 31.9, 31.4, 30.6, 30.1, 29.15, 29.12, 28.2, 27.8, 27.7, 26.1, 25.1, 24.2, 21.6, 21.2, 20.0, 18.1, 17.3, 16.2, 15.5, 15.0 ppm.

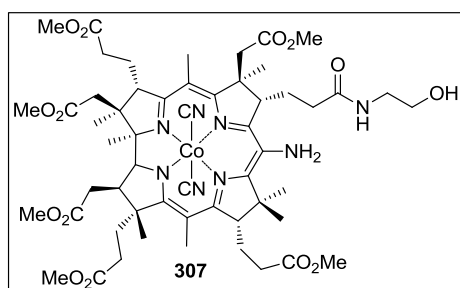
**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*d*-(2-(2-(2-(2-azydoetoksy)etoksy)etoksy)etyloamid))(10-NHBoc)(OMe)<sub>6</sub> (306)**

Otrzymano według procedury 6: Laktam **303** (24 mg, 0.02 mmol), NaCN (6 mg, 0.12 mmol), TEA (46  $\mu$ L, 0.33 mmol) oraz 2-(2-(2-(2-azydoetoksy)etoksy)etoksy)etyloaminę (46 mg, 0.21 mmol) rozpuszczono w DMF (0.5 mL) i mieszano przez 32 godziny. Surową



mieszanie reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 1-5%). Wyizolowany produkt rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany *d*-amid **306** otrzymano w postaci fioletowego proszku (13 mg, 44%). t.t. 91-93 °C.  $R_f = 0.32$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>66</sub>H<sub>96</sub>CoN<sub>11</sub>O<sub>18</sub>: C 57.01, H 6.96, N 11.08; otrzymano: C 57.00, H 7.09, N 10.89. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>65</sub>H<sub>96</sub>CoN<sub>10</sub>O<sub>18</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1363.62306; otrzymano: 1363.62394. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 285 (9.03×10<sup>3</sup>), 310 (8.51×10<sup>3</sup>), 319 (8.78×10<sup>3</sup>), 372 (3.32×10<sup>4</sup>), 424 (2.82×10<sup>3</sup>), 555 (8.59×10<sup>3</sup>), 594 (1.04×10<sup>4</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.20 (s, 0.8H), 7.89 (s, 0.2H), 7.24 (t,  $J = 5.5$  Hz, 0.8H), 7.2-7.1 (m, 0.2H), 3.77 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.58 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 3.55 (s, 3H), 3.54-3.52 (m, 2H), 3.5-3.4 (m, 6H), 3.51 (s, 3H), 3.38 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 3.32-3.28 (m, 2H), 3.19-3.11 (m, 1H), 3.11-2.99 (m, 2H), 2.85-2.75 (m, 1H), 2.74-2.54 (m, 4H), 2.5-2.2 (m, 7H), 2.23-2.08 (m, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.07-1.98 (m, 1.5H), 1.98-1.86 (m, 3.5H), 1.8-1.6 (m, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.42 (s, 7H), 1.40 (s, 2H), 1.32 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.26 (s, 2H), 1.18 (s, 3H), 1.11-1.06 (m, 0.8H), 1.00 (s, 2.2H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 175.1, 174.6, 174.5, 173.5, 173.3, 172.4, 172.34, 172.31, 172.1, 171.6, 170.5, 163.8, 162.2, 155.4, 104.2, 103.9, 101.5, 82.2, 78.3, 73.6, 69.8, 69.7, 69.6, 69.5, 69.2, 69.0, 57.5, 56.0, 53.9, 52.4, 52.0, 51.7, 51.6, 51.4, 51.2, 50.9, 50.0, 47.4, 46.6, 45.1, 41.1, 40.7, 38.4, 33.0, 32.1, 31.4, 30.6, 30.1, 29.2, 29.1, 28.2, 27.8, 26.3, 25.2, 24.3, 21.6, 21.2, 18.1, 17.3, 16.2, 15.5, 15.0 ppm.

### (CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*d*-(2-hydroksyetyloamid))(10-NH<sub>2</sub>)(OMe)<sub>6</sub> (**307**)

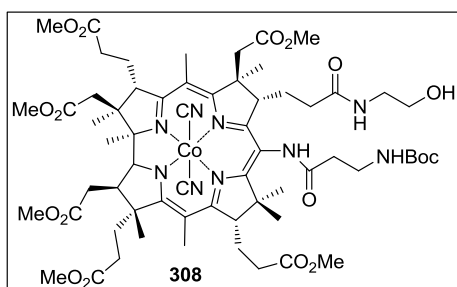


Amid **304** (111 mg, 0.09 mmol) oraz Et<sub>3</sub>SiH (21  $\mu$ L, 0.13 mmol) rozpuszczono w bezwodnym DCM (3 mL) i w atmosferze argonu wkroplono TFA (2 mL). Reakcję mieszało w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła przez 30 minut, rozcieńczono DCM (20 mL) i wylano do wodnego roztworu NaHCO<sub>3</sub> (50 mL).

Mieszanie reakcyjną przemyto wodnymi roztworami NaHCO<sub>3</sub> oraz NaCN. Fazę organiczną osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalnik. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/EtOH, 3-6%), główna frakcja zawierała pożądany produkt. Otrzymany amid **307** rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono cykloheksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany produkt **307** otrzymano w postaci niebieskiego proszku (62 mg, 61%).

t.t. 113-116 °C.  $R_f = 0.37$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 7%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>55</sub>H<sub>77</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>14</sub>+H<sub>2</sub>O: C 57.38, H 6.92, N 9.73; otrzymano: C 57.46, H 6.94, N 9.60. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>55</sub>H<sub>77</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>14</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 1155.47834; otrzymano: 1155.47582. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 313 (9.18×10<sup>3</sup>), 372 (3.13×10<sup>4</sup>), 425 (2.71×10<sup>3</sup>), 557 (8.06×10<sup>3</sup>), 594 (9.46×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.28 (t,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 4.24 (t,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.96 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H), 3.88 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 3.56 (q,  $J = 4.5$  Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.36-3.28 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.83 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H), 2.81-2.71 (dt,  $J = 3.1, 10.0$  Hz, 1H), 2.7-2.6 (m, 3H), 2.58 (s, 2H), 2.52-2.45 (m, 1H), 2.45-2.25 (m, 8H), 2.25-2.16 (m, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03-1.97 (m, 1H), 1.94 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.86 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 1.46 (s, 2H), 1.38 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.95 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 175.0, 174.9, 173.7, 173.2, 172.7, 172.4, 172.0, 171.7, 171.0, 163.5, 163.1, 113.4, 104.0, 101.7, 82.7, 74.7, 62.0, 61.8, 58.2, 56.7, 55.5, 52.9, 51.7, 51.4, 51.30, 51.26, 48.7, 48.1, 45.8, 43.5, 42.8, 41.6, 39.7, 33.8, 33.1, 33.0, 31.7, 30.2, 29.8, 29.0, 28.2, 28.1, 28.0, 27.2, 25.5, 25.0, 22.2, 22.1, 20.0, 18.0, 16.9, 15.9, 15.7 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(*d*-(2-hydroksyetyloamid))(10-(NHCO- $\beta$ -Ala-NHBoc))(OMe)<sub>6</sub> (308)**

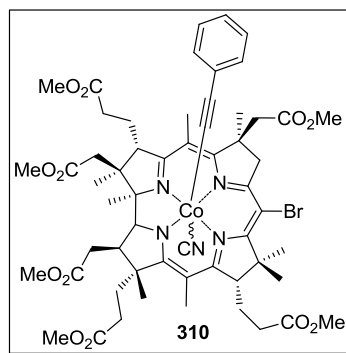


Otrzymano według procedury 4: Aminę **307** (9.8 mg, 8.7  $\mu$ mol), Boc- $\beta$ -alaninę (6.8 mg, 36  $\mu$ mol) oraz EDC·HCl (6.8 mg, 36  $\mu$ mol) rozpuszczono w DCM (0.5 mL) i mieszano w temperaturze 0 °C przez 3 godziny, a następnie pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Surową mieszaninę

reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 2-4%). Otrzymany związek rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Požadany produkt **308** otrzymano w postaci fioletowego proszku (8.4 mg, 74%). t.t. 143-147 °C.  $R_f = 0.53$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EtOH, 10%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>63</sub>H<sub>90</sub>CoN<sub>9</sub>O<sub>17</sub>+2H<sub>2</sub>O: C 56.45, H 7.07, N 9.40; otrzymano: C 56.60, H 6.97, N 9.26. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>62</sub>H<sub>90</sub>CoN<sub>8</sub>O<sub>17</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1277.57504; otrzymano: 1277.57743. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 285 (8.93×10<sup>3</sup>), 309 (7.89×10<sup>3</sup>), 319 (8.25×10<sup>3</sup>), 372 (2.99×10<sup>4</sup>), 424 (2.79×10<sup>3</sup>), 556 (7.74×10<sup>3</sup>), 593 (8.78×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.65 (s, 0.1H), 9.24 (s, 0.9H), 7.14 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 6.84-6.74 (m, 0.2H), 6.58 (t,  $J = 5.8$  Hz, 0.8H), 4.6-4.5 (m, 1H), 3.73 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.3-3.2

(m, 3H), 3.2-2.9 (m, 5H), 2.82 (m, 1H), 2.7-2.5 (m, 4H), 2.5-2.4 (m, 3H), 2.4-2.2 (m, 5H), 2.2-2.1 (m, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.1-2.0 (m, 2H), 1.96-1.87 (m, 2H), 1.86-1.60 (m, 4H), 1.56 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.40 (s, 8H), 1.37 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.24 (s, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.03 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 0.95 (s, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 175.2, 174.7, 174.0, 173.5, 172.5, 172.4, 172.35, 172.32, 172.2, 171.6, 171.4, 171.3, 163.5, 162.0, 155.4, 104.2, 103.8, 101.6, 82.3, 77.7, 73.6, 59.8, 57.5, 56.0, 53.8, 52.5, 52.0, 51.68, 51.65, 51.5, 51.3, 47.2, 46.9, 45.7, 45.2, 41.3, 41.2, 40.7, 36.5, 36.1, 35.4, 33.0, 32.0, 31.4, 30.6, 30.3, 29.2, 28.2, 26.6, 25.1, 24.3, 23.0, 21.6, 21.5, 19.2, 18.1, 17.3, 16.2, 15.4, 15.0, 13.5 ppm.

### (2-Fenylopropyno)(CN)Cby(III)(10-Br)(OMe)<sub>7</sub> (**310**)

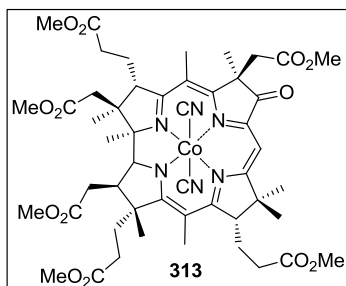


W atmosferze argonu bromek **282** (15 mg, 13  $\mu\text{mol}$ ), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5 mg, 2.1  $\mu\text{mol}$ ) oraz jodek miedzi(I) (5.5 mg, 0.03 mmol) rozpuszczono w bezwodnej mieszaninie TEA (0.8 mL) i THF (1.1 mL). Do reakcji wkroplono fenyloacetylen (14  $\mu\text{L}$ , 0.13 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono DCM (25 mL) i przemyto wodnym roztworem

NaCN. Fazę organiczną osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalniki. Otrzymaną surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na tlenku glinu (MTBE/MeOH, 0.5-2.5%). Główną frakcję zawierającą pożądaną produkt odparowano. Suchą pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości AcOEt i strącono *n*-heksanem. Powstały osad odwirowano i osuszono. Produkt **310** otrzymano w postaci niebieskofioletowego proszku (6 mg, 37%).  $R_f = 0.60$  (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MTBE/MeOH, 2.5%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>61</sub>H<sub>77</sub>BrCoN<sub>5</sub>O<sub>14</sub>+H<sub>2</sub>O: C 59.82, H 6.76, N 9.39; otrzymano: C 59.80, H 6.73, N 9.17. LRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>60</sub>H<sub>77</sub>BrCoN<sub>4</sub>O<sub>14</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1215.4; otrzymano: 1215.6, profil izotopowy zgodny z teoretycznym. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 264 (2.49×10<sup>4</sup>), 375 (1.81×10<sup>4</sup>), 579 (7.93×10<sup>3</sup>), 616 (7.35×10<sup>3</sup>) nm.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.03 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 6.97 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 6.79 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 4.03 (t,  $J = 4.7$  Hz, 1H), 3.71-3.64 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.65 (s, 6H), 3.62 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.47 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 3.12 (m, 1H), 2.8-2.5 (m, 6H), 2.5-2.4 (m, 4H), 2.37 (s, 2H), 2.31 (m, 2H), 2.22-2.08 (m, 4H), 2.153 (s, 3H), 2.146 (s, 3H), 1.96-1.85 (m, 2H), 1.8-1.6 (m, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.18 (s, 6H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 173.5, 173.3, 173.0, 172.9, 172.4,

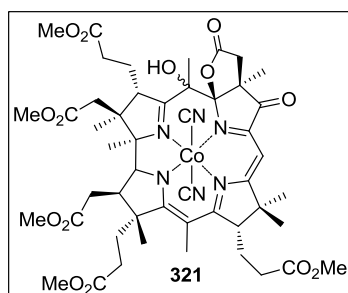
172.3, 172.3, 171.7, 170.6, 170.4, 169.1, 162.4, 161.1, 135.0, 130.2, 127.4, 127.3, 124.6, 105.1, 104.5, 103.6, 102.8, 86.9, 82.2, 74.5, 57.5, 56.2, 55.4, 54.3, 51.9, 51.7, 51.6, 51.5, 51.4, 51.1, 50.8, 49.7, 46.4, 45.1, 42.1, 40.7, 33.0, 31.7, 31.0, 29.6, 29.4, 29.1, 27.8, 25.3, 25.2, 24.0, 23.2, 23.1, 18.7, 18.0, 16.1, 15.5 ppm.

### (CN)<sub>2</sub>Cby(III)(8-CO)(OMe)<sub>6</sub> (**313**)



Octan palladu(II) (0.6 mg, 2.8  $\mu\text{mol}$ ), trifenylofosfinę (1.4 mg, 5.5  $\mu\text{mol}$ ) i heptaester **3** (15 mg, 14  $\mu\text{mol}$ ) odważono w naczyniu Schlenka. Bezwodny DMF nasycono tlenem, poprzez przepuszczanie delikatnego strumienia gazu przez godzinę, dodano wody (stężenie 0.07 M), a następnie sporządzony roztwór (0.2 mL) dodano do odważonych

odczynników. Mieszaninę reakcyjną mieszano w atmosferze tlenu, bez dostępu światła w temperaturze 80 °C przez 4.5 godziny, a następnie rozcieńczono DCM (20 mL) i wylano do wodnego roztworu NaCN. Produkt ekstrahowano DCM (2×20 mL), a połączone fazy organiczne osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalniki. Otrzymaną surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (toluen/MeOH, 0.8-3%). Pierwsza frakcja o kolorze niebieskim zawierała produkt. Po odparowaniu, produkt **313** rozpuszczono w minimalnej ilości benzenu i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Kobryketon **313** otrzymano w postaci zielononiebieskiego proszku (4.5 mg, 32%). t.t. 140-142 °C.  $R_f$  = 0.41 (SiO<sub>2</sub>, toluen/MeOH, 15%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>50</sub>H<sub>65</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>13</sub>: C 59.05, H 6.44, N 8.26; otrzymano: C 58.89, H 6.55, N 8.04. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>49</sub>H<sub>65</sub>CoN<sub>5</sub>O<sub>13</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 990.3905; otrzymano: 990.3914. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 305 (5.63×10<sup>3</sup>), 324 (5.30×10<sup>3</sup>), 380 (2.13×10<sup>4</sup>), 436 (3.53×10<sup>3</sup>), 461 (3.63×10<sup>3</sup>), 623 (7.94×10<sup>3</sup>), 673 (7.93×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 6.41 (s, 1H), 4.00 (d,  $J$  = 10.4 Hz, 1H), 3.63 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.29 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 3.10 (d,  $J$  = 16.2 Hz, 1H), 2.92-2.83 (m, 2H), 2.82 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 2.75 (d,  $J$  = 16.2 Hz, 1H), 2.76-2.68 (m, 1H), 2.6-2.5 (m, 2H), 2.5-2.3 (m, 3H), 2.3-2.1 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 2.11-1.95 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.9-1.7 (m, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.92 (s, 6H), 0.89 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>,)  $\delta$ : 200.8, 178.6, 176.2, 174.0, 173.6, 172.7, 172.2, 171.9, 171.7, 168.8, 163.7, 157.2, 152.3, 105.9, 105.6, 87.6, 83.4, 76.0, 58.7, 57.6, 54.2, 53.3, 51.7, 51.5, 51.3, 51.2, 51.0, 50.4, 47.6, 46.7, 42.2, 41.1, 39.8, 34.3, 33.4, 31.7, 30.7, 30.0, 29.9, 25.9, 24.9, 23.0, 21.5, 19.3, 18.6, 16.6, 16.0, 14.9 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(5-OH)(6-O-*c*-lakton)(8-CO)(OMe)<sub>5</sub> (321)**

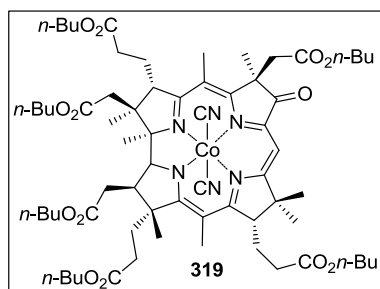
Octan palladu(II) (12 mg, 0.06 mmol), trifenylofosfinę (14 mg, 0.06 mmol) i heptaester **3** (300 mg, 0.28 mmol) odważono w naczyniu Schlenka. Bezwodny DMF nasycono tlenem, poprzez przepuszczanie delikatnego strumienia gazu przez godzinę, dodano wody (stężenie 0.07 M), a następnie sporządzony roztwór (4 mL) dodano do odważonych

odczynników. Mieszanie reakcyjną mieszano w przepływie tlenu przez 6 godzin. Następnie, rozcieńczono toluenem (20 mL) i wylano do wodnego roztworu NaCN. Produkt ekstrahowano toluenem (2×30 mL), a połączone fazy organiczne osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Otrzymaną surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (toluen/MeOH, 0.5-3%). Pierwszą frakcję (kolor niebieskofioletowy) odparowano i rozpuszczono w minimalnej ilości benzenu i strącono *n*-heksanem. Powstały osad odwirowano i osuszono otrzymując lakton **321** w postaci niebieskofioletowego ciała stałego (13 mg, 4%).  $R_f = 0.42$  (SiO<sub>2</sub>, toluen/MeOH, 15%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>49</sub>H<sub>63</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>14</sub>: C 57.76, H 6.23, N 8.25; otrzymano: C 57.91, H 6.33, N 8.09. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>49</sub>H<sub>63</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>14</sub>Na [M-CN]<sup>+</sup> 1041.3632; otrzymano: 1041.3634. UV/Vis MeCN,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 352 (1.91×10<sup>4</sup>), 569 (1.24×10<sup>4</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 5.71 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 3.93 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 3.71 (t,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 2.98 (m, 2H), 2.83-2.72 (m, 2H), 2.71 (d,  $J = 17.4$  Hz, 1H), 2.65-2.56 (m, 3H), 2.48 (d,  $J = 17.4$  Hz, 1H), 2.49-2.41 (m, 1H), 2.37 (ddd,  $J = 15.5, 9.5, 3.9$  Hz, 1H), 2.24-2.06 (m, 5H), 2.13 (s, 3H), 2.03-1.74 (m, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.67 (m, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 0.93 (s, 6H), 0.91 (s, 3H), 0.82 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>,)  $\delta$ : 197.8, 188.1, 177.8, 174.7, 173.2, 173.1, 172.7, 171.5, 171.0, 166.2, 163.5, 160.1, 128.0, 104.2, 92.1, 87.3, 84.6, 83.5, 76.2, 58.5, 56.9, 54.0, 51.8, 51.7, 51.5, 51.2, 51.1, 49.7, 49.1, 47.5, 42.3, 40.7, 36.9, 34.3, 33.2, 31.3, 30.4, 30.0, 29.2, 25.7, 23.8, 22.9, 19.9, 19.5, 19.4, 17.7, 16.9, 15.1 ppm.

Tabela 21. Tabela zaobserwowanych sprzężeń w widmach dwuwymiarowych ksantokobryketonu **321**.

Przypisanie	<sup>13</sup> C NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje		Przypisanie	<sup>13</sup> C NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje	
		SQC	HMBC			HSQC	HMBC
C8	197.8		C10, C42*, C43	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	51.10		
C4	188.1		C38, C31*, C3	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	51.09		
C11	177.8		C10, C13, C45 C46	C7	49.6		C37, C42, C43
C16	174.7		C54, C55*, C53, C19	C2	49.1		C19, C20 C25, C26, C3, C31
C49	173.2		C52, C48, C47, C13	C12	47.5		C10, C45, C46, C47, C13
C33	173.0		C36, C32, C31	C26	42.3	2.13 oraz 2.73	C3, C25
C57	172.6		C60, C56, C55	C18	40.7	2.98	C54, C61, C55, C20, C19
C62	171.5		C65, C61, C18	C42	36.9	2.47 oraz 2.70	C43
C27	171.0		C30, C26	C32	34.3	2.60 oraz 2.97	C31, C3
C40	166.2		C42	C55	33.2	1.78 oraz 2.36	C54, C56, C18, C19, C61*
C14	163.5		C53, C19, C13, C47, C10	C61	31.3	2.11 oraz 2.18	C18, C19, C54
C9	160.1			C48	30.4	2.16 oraz 2.60	C47, C13
C15	104.2		C53, C19, C10	C56	30.0	2.44 oraz 2.76	C54, C55
C6	92.1		C38, C43, C42*, C37, C10	C46	29.2	0.92	C13, C45
C5	87.3		C38, C37	C47	25.7	1.66 oraz 1.90	C45, C48, C13
C1	84.6		C18, C19, C20, C25, C26, C3	C43	23.8	0.92	C42
C10	83.5	5.70		C31	22.9	1.97 oraz 2.09	C3, C32, C25,
C19	76.2	3.92	C18, C20, C61	C20	19.9	1.57	C19
C17	58.5		C54, C61, C55, C18	C38	19.4	1.83	
C3	56.9	3.70	C25, C31, C26, C32	C45	19.3	0.81	C46
C13	54.0	2.59	C45, C46, C47, C48	C54	17.7	0.90	C18
CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	51.8			C25	16.8	1.22	C20, C26
CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	51.7			C53	15.0	2.12	
CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	51.5			C37	–	5.38	

\*Zaobserwowano sprzężenie tylko z jednym z diastereotopowych protonów.

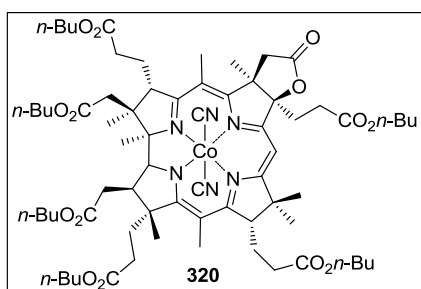
**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(8-CO)(O-*n*-Bu)<sub>6</sub> (319)**

Octan palladu(II) (5.5 mg, 11  $\mu$ mol), trifenylofosfinę (5.8 mg, 22  $\mu$ mol) i ester butylowy kwasu kobyrynowego **318** (77 mg, 55  $\mu$ mol) odważono w naczyniu Schlenka. Bezwodny DMF nasycono tlenem, poprzez przepuszczanie delikatnego strumienia gazu przez godzinę, dodano wody (stężenie 0.07 M), a następnie sporządzony roztwór (0.8 mL) dodano

do odważonych odczynników. Powstały roztwór mieszano w przepływie tlenu przez 24 godziny, następnie rozcieńczono DCM (20 mL) i wylano do wodnego roztworu NaCN. Produkt ekstrahowano DCM (3 $\times$ 20 mL), a połączone fazy organiczne osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalniki. Otrzymaną surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/*i*-PrOH, 0.5-3%). Frakcję (kolor zielononiebieski) zawierającą wyizolowany produkt **319** odparowano do sucha otrzymując zielononiebieskie ciało stałe (14.5 mg, 21%). t.t. 114-117 °C. R<sub>f</sub> = 0.41 (SiO<sub>2</sub>, *n*-heksan/*i*-PrOH, 15%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>68</sub>H<sub>101</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>13</sub>+H<sub>2</sub>O: C 63.43, H 8.06, N 6.53; otrzymano: C 63.27, H 8.01, N 6.30. HRMS ESI (*m/z*) obliczono dla C<sub>67</sub>H<sub>101</sub>CoN<sub>5</sub>O<sub>13</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1242.6728; otrzymano: 1242.6771. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> $\times$ cm<sup>-1</sup>): 305 (6.82 $\times$ 10<sup>3</sup>), 380 (2.57 $\times$ 10<sup>4</sup>), 434 (4.30 $\times$ 10<sup>3</sup>), 460 (4.21 $\times$ 10<sup>3</sup>), 623 (9.91 $\times$ 10<sup>3</sup>), 673 (1.01 $\times$ 10<sup>4</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 6.40 (s, 1H), 4.22 (m, 2H), 4.14-3.93 (m, 10H), 3.93-3.86 (m, 3H), 3.10 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.0-2.9 (m, 2H), 2.9-2.8 (m, 2H), 2.76 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 2.71-2.44 (m, 5H), 2.41-2.25 (m, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.24-1.97 (m, 5H), 2.13 (s, 3H), 1.96-1.88 (m, 1H), 1.82-1.72 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.50-1.31 (m, 16H), 1.30 (s, 3H), 1.28-1.12 (m, 15H), 0.91 (s, 3H), 0.85-0.72 (m, 18H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 200.8, 178.5, 176.3, 174.1, 173.3, 172.4, 172.0, 171.7, 171.4, 168.3, 163.8, 157.3, 152.5, 105.8, 105.7, 87.6, 83.5, 76.1, 66.0, 65.1, 64.8, 64.7, 64.6, 64.2, 58.8, 57.7, 54.2, 50.4, 47.5, 46.7, 42.5, 41.3, 39.8, 34.5, 33.6, 32.0, 31.03, 30.95, 30.92, 30.89, 30.74, 30.72, 30.69, 30.3, 30.2, 30.1, 25.9, 25.0, 23.0, 21.4, 19.5, 19.42, 19.37, 19.34, 19.1, 18.7, 16.7, 15.8, 14.9, 13.9, 13.79, 13.78, 13.73, 13.70 ppm.

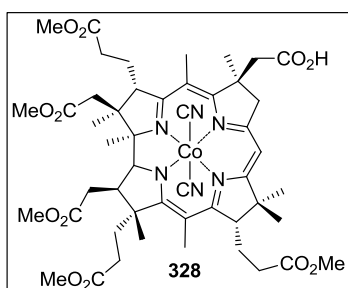
**(CN)<sub>2</sub>Cby(III)(8-O-*c*-lakton)(O-*n*-Bu)<sub>6</sub> (320)**

Octan palladu(II) (5.5 mg, 11  $\mu$ mol), trifenylofosfinę (5.8 mg, 22  $\mu$ mol) i ester butylowy kwasu kobyrynowego **318** (77 mg, 55  $\mu$ mol) odważono w naczyniu Schlenka. Bezwodny DMF nasycono tlenem, poprzez przepuszczanie delikatnego strumienia gazu przez godzinę, dodano wody (stężenie 0.07 M), a następnie sporządzony roztwór (0.8 mL) dodano do



odważonych odczynników. Mieszaninę reakcyjną mieszano w przepływie tlenu przez 24 godziny, następnie rozcieńczono DCM (20 mL) i wylano do wodnego roztworu NaCN. Produkt ekstrahowano DCM (3×20 mL), a połączone fazy organiczne osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Otrzymaną surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/*i*-PrOH, 0.5-3%). Frakcję (kolor czerwono-fioletowy) zawierającą wyizolowany produkt odparowano do sucha, otrzymując lakton **320** w postaci czerwono-fioletowego ciała stałego (9 mg, 13%). t.t. 98-102 °C.  $R_f = 0.32$  (SiO<sub>2</sub>, *n*-heksan/*i*-PrOH, 15%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>71</sub>H<sub>105</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>14</sub>+H<sub>2</sub>O: C 63.47, H 8.03, N 6.25; otrzymano: C 63.63, H 7.95, N 6.16. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>70</sub>H<sub>105</sub>CoN<sub>5</sub>O<sub>14</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 1298.6990; otrzymano: 1298.7003. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 279 (1.06×10<sup>3</sup>), 319 (9.50×10<sup>3</sup>), 370 (2.65×10<sup>4</sup>), 422 (2.80×10<sup>3</sup>), 577 (9.03×10<sup>3</sup>), 595 (1.03×10<sup>4</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 5.87 (s, 1H), 4.2-3.9 (m, 14H), 3.02 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H), 2.94 (m, 1H), 2.8-2.6 (m, 4H), 2.62-2.34 (m, 8H), 2.3-2.2 (m, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.20-1.93 (m, 5H), 1.96 (s, 3H), 1.87 (m, 1H), 1.78 (m, 1H), 1.5-1.1 (m, 30H), 0.98 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.84-0.75 (m, 15H), 0.73 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H), 0.68 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 178.7, 176.1, 175.4, 173.3, 172.4, 172.2, 171.93, 171.89, 171.7, 171.4, 166.0, 163.6, 160.6, 104.2, 103.8, 93.7, 89.1, 83.1, 75.5, 65.1, 64.9, 64.64, 64.59, 64.57, 64.1, 58.6, 57.2, 54.1, 50.7, 47.5, 46.2, 42.2, 41.9, 39.8, 33.9, 33.3, 32.0, 31.04, 30.99, 30.91, 30.85, 30.73, 30.71, 30.4, 30.2, 29.2, 26.0, 25.0, 22.3, 19.43, 19.37, 19.36, 19.33, 19.33, 19.29, 18.9, 18.2, 17.04, 17.02, 15.7, 13.82, 13.80, 13.78, 13.74, 13.65 ppm.

### (CN)<sub>2</sub>-8-*nor*-Cby(III)(*c*-CO<sub>2</sub>H)(OMe)<sub>5</sub> (**328**)

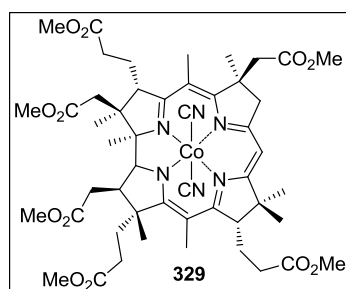


Kobryketon **313** (61 mg, 0.06 mmol) rozpuszczono w toluenie (4 mL) i dodano kwas octowy (0.8 mL). Przez umieszczoną w płuczce ultradźwiękowej mieszaninę przepuszczano delikatny strumień argonu przez godzinę. Następnie dodano świeżo zaktywowany pył cynkowy (0.9 g, 14 mmol) i intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej przez 30 minut bez dostępu światła. Mieszaninę reakcyjną przesączono przez warstwę celitu<sup>®</sup> i produkt ekstrahowano wodnym roztworem NaHCO<sub>3</sub> (3×50 mL). Połączone fazy wodne przemyto toluenem (25 mL), a następnie dodano NaCN (100 mg) i ekstrahowano DCM (4×25 mL). Połączone



fazy organiczne osuszono bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , odsączono i odparowano rozpuszczalnik do sucha. Pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości DCM i strącono *n*-heksanem, a powstały osad odwirowano i osuszono. Pożądany produkt **328** otrzymano w postaci czerwonego proszku (48 mg, 81%).  $R_f = 0.46$  ( $\text{SiO}_2$ , toluen/MeOH, 25%). HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $\text{C}_{48}\text{H}_{65}\text{CoN}_5\text{O}_{12}$   $[\text{M}-\text{CN}]^+$  962.3962; otrzymano: 962.3951. Ze względu na obecność w strukturze grupy karboksylowej analiza NMR nie była możliwa (zob. Badania własne str. 89).

### (CN)<sub>2</sub>-8-nor-Cby(III)(OMe)<sub>6</sub> (**329**)



*c*-Kwas **328** (29 mg, 29  $\mu\text{mol}$ ), EDC·HCl (14 mg, 88  $\mu\text{mol}$ ) oraz DMAP (11 mg, 88  $\mu\text{mol}$ ) rozpuszczono w DCM (3 mL), w temperaturze 0 °C. W atmosferze argonu, do mieszaniny reakcyjnej wkroplono metanol. Następnie łaźnię chłodzącą usunięto i mieszanie kontynuowano w temperaturze pokojowej przez 16 godzin, w ciemności. Mieszaninę reakcyjną

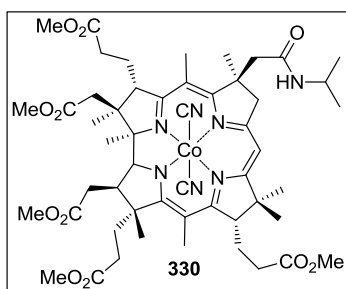
rozcieńczono DCM (25 mL) i przemyto wodnym roztworem NaCN. Fazę organiczną osuszono bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , odsączono i odparowano. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (toluen/MeOH, 0.5-4%). Główna frakcja zawierała produkt, którą odparowano i suchą pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości benzenu i strącono *n*-heksanem, powstały osad odwirowano i osuszono. Heksaester **329** otrzymano w postaci fioletowego proszku (19 mg, 65%). t.t. 178-182 °C.  $R_f = 0.37$  ( $\text{SiO}_2$  toluen/MeOH, 15%). Anal. elem. obliczono dla  $\text{C}_{50}\text{H}_{67}\text{CoN}_6\text{O}_{12} + \text{H}_2\text{O}$ : C 58.82, H 6.81, N 8.23; otrzymano: C 58.97, H 6.84, N 8.02. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $\text{C}_{50}\text{H}_{67}\text{CoN}_6\text{O}_{12}$   $[\text{M}]^+$  1002.4149; otrzymano: 1002.4133. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ): 277 ( $8.21 \times 10^3$ ), 311 ( $8.52 \times 10^3$ ), 370 ( $2.54 \times 10^4$ ), 417 ( $2.46 \times 10^3$ ), 546 ( $8.52 \times 10^3$ ), 584 ( $8.75 \times 10^3$ ) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$ : 5.33 (s, 1H), 3.98 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 3.75 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.38 (d,  $J = 17.7$  Hz, 1H), 3.364 (s, 3H), 3.362 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.94 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 2.85 (td,  $J = 10.1, 3.1$  Hz, 1H), 2.78 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 2.77-2.68 (m 2H), 2.56 (d,  $J = 17.7$  Hz, 1H), 2.5-2.3 (m, 8H), 2.24 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.2-2.1 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 2.08-1.97 (m, 1H), 1.96-1.74 (m, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.95 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$ : 176.4, 175.4, 174.7, 173.8, 172.9, 172.3, 172.1, 171.7, 170.5, 168.5, 164.7, 163.9, 103.7, 102.3, 89.9, 82.9, 75.4, 58.4, 57.4, 53.8, 51.7, 51.5, 51.4, 51.3, 51.2, 51.0, 49.6,

46.7, 46.3, 44.8, 42.2, 41.4, 39.8, 34.2, 33.3, 31.9, 30.9, 30.7, 30.0, 26.0, 24.9, 24.7, 22.5, 19.6, 18.4, 16.8, 15.5, 15.4 ppm.

### 7. Sprzężanie *c*-kwasu **328** z aminami

W atmosferze argonu, *c*-kwas **328** (0.03 mmol), DIPEA (0.07 mmol) oraz aminę (0.14 mmol) rozpuszczono w bezwodnym DMF (2 mL). Następnie, do reakcji wkroplono DEPC (0.14 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Mieszaninę rozcieńczono DCM (25 mL) i przemyto wodnym roztworem NaCN. Fazę organiczną osuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odsączono i odparowano rozpuszczalniki. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym. Główna frakcja zawierała pożądany produkt.

#### (CN)<sub>2</sub>-8-*nor*-Cby(III)(*c*-(2-propyloamid))(OMe)<sub>5</sub> (**330**)



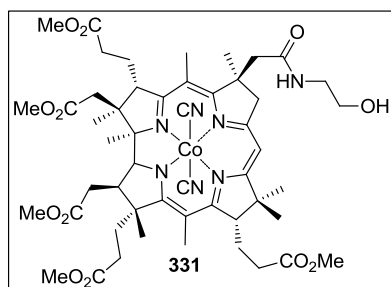
Otrzymano według procedury 7: *c*-Kwas **328** (30 mg, 0.03 mmol), DIPEA (12  $\mu$ L, 0.07 mmol), izopropylaminę (11  $\mu$ L, 0.14 mmol) oraz DEPC (22  $\mu$ L, 0.14 mmol) rozpuszczono w DMF (2 mL) i mieszano przez 16 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/MeOH, 0.5-2.5%).

Główną frakcję zawierającą pożądany produkt odparowano. Suchą pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości benzenu i strącono *n*-heksanem. Osad odwirowano i osuszono, *c*-amid **330** otrzymano w postaci fioletowego proszku (26 mg, 82%). t.t. 149-151 °C.  $R_f$  = 0.35 (SiO<sub>2</sub> toluen/MeOH, 15%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>52</sub>H<sub>72</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>11</sub>+2H<sub>2</sub>O: C 58.58, H 7.19, N 9.20; otrzymano: C 58.75, H 7.22, N 9.17. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>52</sub>H<sub>72</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>11</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 1052.4520; otrzymano: 1052.4518. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 278 (1.06×10<sup>4</sup>), 312 (9.13×10<sup>3</sup>), 371 (2.60×10<sup>4</sup>), 422 (2.48×10<sup>3</sup>), 547 (8.26×10<sup>3</sup>), 587 (1.01×10<sup>4</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>)  $\delta$ : 7.04-6.93 (m, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.15 (dq,  $J$  = 13.5, 6.7 Hz, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.74 (d,  $J$  = 10.6 Hz, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 2.83-2.76 (m, 2H), 2.73 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H), 2.70-2.18 (m, 13H), 2.16 (s, 6H), 2.14-2.06 (m, 1H), 2.0-1.9 (m, 3H), 1.8-1.6 (m, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.05 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 3H), 1.04 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.89 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>)  $\delta$ : 176.0, 175.5, 175.3, 173.8, 172.8, 172.3, 171.8, 171.6, 168.6, 163.8, 163.6, 106.1, 102.1, 90.4, 83.1, 75.1, 58.5, 57.4, 53.8, 52.4, 51.7,

51.4, 51.3, 51.2, 51.0, 48.0, 46.5, 46.1, 46.0, 41.6, 41.5, 39.8, 33.8, 32.9, 31.9, 31.5, 30.6, 29.8, 25.8, 24.9, 23.2, 22.7, 22.6, 22.4, 19.5, 18.0, 16.9, 16.1, 15.6 ppm.

**(CN)<sub>2</sub>-8-nor-Cby(III)(*c*-(2-hydroksyetyloamid))(OMe)<sub>5</sub> (331)**

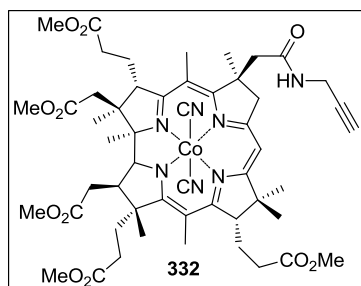
Otrzymano według procedury 7: *c*-Kwas **328** (30 mg, 0.03 mmol), DIPEA (12 μL, 0.07 mmol), etanoloaminę (8 μL, 0.14 mmol) oraz DEPC (22 μL, 0.14 mmol) rozpuszczono w DMF (2 mL) i mieszano przez 16 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/EtOH, 1-5%). Główną frakcję zawierającą pożądaný produkt odparowano. Suchą pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości benzenu



i strącono *n*-heksanem. Osad odwirowano i osuszono, *c*-amid **331** otrzymano w postaci fioletowego proszku (28 mg, 90%). t.t. 138-142 °C. R<sub>f</sub> = 0.45 (SiO<sub>2</sub> toluen/MeOH, 20%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>51</sub>H<sub>70</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>12</sub>+2H<sub>2</sub>O: C 57.35, H 6.98, N 9.18; otrzymano: C 57.38, H 6.77, N 9.17. HRMS ESI (*m/z*) obliczono dla C<sub>51</sub>H<sub>70</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>12</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 1054.4312;

otrzymano: 1054.4303. UV/Vis, λ (ε, M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 278 (1.09×10<sup>4</sup>), 311 (9.18×10<sup>3</sup>), 370 (2.71×10<sup>4</sup>), 420 (2.49×10<sup>3</sup>), 547 (8.68×10<sup>3</sup>), 586 (9.52×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>) δ: 7.05-7.00 (m, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.69 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 3.53 (m, 2H), 3.43 (s, 3H), 3.41-3.37 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 2.83-2.76 (m, 3H), 2.67 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.48 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 2.45-2.32 (m, 5H), 2.3-2.2 (m, 2H), 2.2-2.1 (m, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.03-1.86 (m, 4H), 1.76 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.85 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>) δ: 176.2, 175.8, 175.7, 173.7, 172.7, 172.2, 171.9, 171.6, 169.6, 168.4, 163.7, 162.7, 106.9, 102.3, 90.3, 83.0, 75.1, 61.9, 58.5, 57.0, 53.8, 52.4, 51.7, 51.3, 51.2, 51.0, 48.0, 46.7, 46.5, 46.4, 43.8, 41.7, 39.7, 33.9, 32.8, 31.7, 31.5, 30.5, 29.8, 25.7, 24.9, 23.6, 22.4, 19.5, 17.9, 17.0, 15.7, 15.6 ppm.

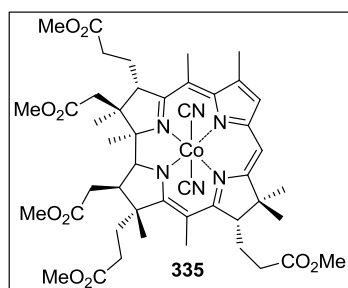
**(CN)<sub>2</sub>-8-nor-Cby(III)(*c*-propargiloamid)(OMe)<sub>5</sub> (332)**



Otrzymano według procedury 7: *c*-Kwas **328** (10 mg, 0.01 mmol), DIPEA (4 μL, 23 μmol), propargiloaminę (3 μL, 45 μmol) oraz DEPC (7 μL, 48 μmol) rozpuszczono w DMF (0.7 mL) i mieszano przez 16 godzin. Surową mieszaninę reakcyjną oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej DCVC (DCM/MeOH, 0.5-2.5%). Główną frakcję zawierającą

pożądany produkt odparowano. Suchą pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości benzenu i strącono *n*-heksanem. Osad odwirowano i osuszono, *c*-amid **332** otrzymano w postaci fioletowego proszku (8.3 mg, 80%). t.t. 145-147 °C.  $R_f = 0.40$  (SiO<sub>2</sub> toluen/MeOH, 15%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>52</sub>H<sub>68</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>11</sub>+H<sub>2</sub>O: C 59.82, H 6.76, N 9.39; otrzymano: C 59.80, H 6.73, N 9.17. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>52</sub>H<sub>68</sub>CoN<sub>7</sub>O<sub>11</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 1048.4207; otrzymano: 1048.4200. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>): 278 (8.84×10<sup>3</sup>), 312 (7.42×10<sup>3</sup>), 371 (2.18×10<sup>4</sup>), 421 (2.07×10<sup>3</sup>), 547 (6.86×10<sup>3</sup>), 587 (8.41×10<sup>3</sup>) nm. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>)  $\delta$ : 7.39 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 5.30 (s, 1H), 3.95 (qdd,  $J = 17.3, 5.4, 2.4$  Hz, 2H), 3.74 (t,  $J = 9.4$  Hz, 2H), 3.43 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 2.84-2.77 (m, 2H), 2.7-2.5 (m, 4H), 2.5-2.3 (m, 7H), 2.3-2.1 (m, 4H), 2.18 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.0-1.9 (m, 2H), 1.93-1.84 (m, 2H), 1.8-1.7 (m, 2H), 1.52 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.94 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, toluen-*d*<sub>8</sub>)  $\delta$ : 178.7, 178.1, 177.9, 176.2, 175.2, 174.8, 174.5, 174.1, 171.7, 170.9, 166.3, 165.8, 108.6, 104.7, 92.8, 85.5, 83.5, 77.6, 73.1, 61.1, 59.9, 56.3, 54.2, 54.1, 53.9, 53.8, 53.7, 53.5, 50.0, 49.1, 48.8, 47.8, 44.3, 42.2, 36.3, 35.5, 34.4, 33.8, 33.1, 32.3, 31.3, 28.3, 27.3, 26.1, 24.9, 22.0, 20.6, 19.4, 18.4, 18.1 ppm.

#### (CN)<sub>2</sub>-*c-d*-di-*nor*-Cby-7-en(III)(OMe)<sub>5</sub> (**335**)

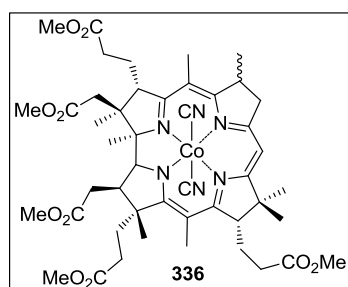


Heksaester **329** (15 mg, 15  $\mu$ mol) zawieszono w dekalinie (1.5 mL) i zawiesinę odgazowano (3 razy cykl próżnia/argon). Mieszaninę reakcyjną poddano działaniu mikrofal (reaktor mikrofalowy, 210 °C, 5 min., moc maksymalna 150 W). Następne czynności prowadzono w atmosferze argonu oraz przy ograniczonym dostępie światła. Do mieszaniny reakcyjnej

dodawano ostrożnie nasycony roztwór NaCN w metanolu do zmiany koloru na zielony. Produkt ekstrahowano metanolem (2×5 mL). Połączone frakcje odparowano. Otrzymaną surową mieszaninę reakcyjną zanieczyszczoną dekaliną ługowano *n*-heksanem (2×5 mL), a następnie oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/MeOH, 0.5-3%). Główną frakcję (kolor zielony) zawierającą pożądany produkt odparowano. Suchą pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości benzenu i strącono *n*-heksanem. Osad odwirowano i osuszono, pożądany produkt **335** otrzymano w postaci zielonego proszku (5.3 mg, 38%).  $R_f = 0.25$  (SiO<sub>2</sub> toluen/MeOH, 10%). Anal. elem. obliczono dla C<sub>47</sub>H<sub>61</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>10</sub>+H<sub>2</sub>O: C 59.61, H 6.71, N 8.87; otrzymano: C 59.93, H 6.77, N 8.88. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla C<sub>46</sub>H<sub>61</sub>CoN<sub>5</sub>O<sub>10</sub> [M-CN]<sup>+</sup> 902.3750; otrzymano: 902.3757.

UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $M^{-1} \times cm^{-1}$ ): 291 ( $1.15 \times 10^4$ ), 335 ( $8.88 \times 10^3$ ), 367 ( $1.46 \times 10^4$ ), 687 ( $9.93 \times 10^3$ ), 730 ( $9.85 \times 10^3$ ) nm.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6.83 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 3.94 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 3.81 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.13 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 2.97-2.91 (m, 1H), 2.74-2.42 (m, 8H), 2.54 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.38-2.15 (m, 5H), 2.30 (s, 3H), 2.13-2.05 (m, 1H), 1.90-1.75 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.43 (s, 6H), 1.29 (s, 3H), 1.27 (s, 3H) ppm.  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 176.0, 175.7, 175.3, 173.9, 172.8, 172.6, 171.9, 171.7, 163.9, 157.6, 151.0, 148.0, 135.5, 128.2, 112.9, 103.4, 92.2, 84.0, 77.2, 74.9, 58.1, 56.8, 53.8, 52.3, 51.8, 51.7, 51.6, 51.5, 47.2, 46.0, 40.7, 39.5, 33.7, 32.6, 31.9, 31.3, 30.6, 29.7, 25.6, 24.9, 23.5, 20.0, 19.4, 18.6, 16.96, 16.95, 15.3 ppm.

### (CN)<sub>2</sub>-c-d-di-nor-Cby(III)(OMe)<sub>5</sub> (336)



Heksaester **329** (15 mg, 15  $\mu$ mol) zawieszono w dekalinie (1 mL) i zawiesinę odgazowano (3 razy cykl próżnia/argon). Mieszaninę reakcyjną poddano działaniu mikrofal (reaktor mikrofalowy, 210 °C, 5 min., moc maksymalna 150 W). Następne czynności prowadzono w atmosferze argonu oraz przy ograniczonym dostępie światła. Reakcję rozcieńczono

lodowatym kwasem octowym (3 mL) i dodano świeżo zaktywowany pył cynkowy (0.6 g, 9 mmol). Po 2 minutach mieszania zawiesinę rozcieńczono DCM (25 mL) i przesączono przez warstwę celitu<sup>®</sup>, a następnie zneutralizowano  $NaHCO_3$ . Produkt ekstrahowano DCM (2 $\times$ 25 mL). Połączone fazy organiczne przemyto wodnym roztworem NaCN, osuszono bezwodnym  $Na_2SO_4$ , odsączono i odparowano rozpuszczalniki. Otrzymaną surową mieszaninę reakcyjną zanieczyszczoną dekalina<sup>®</sup> ługowano *n*-heksanem (2 $\times$ 5 mL), a następnie oczyszczono metodą chromatografii DCVC na żelu krzemionkowym (DCM/MeOH, 0.5-3%). Główną frakcję zawierającą pożądaną produkt odparowano, pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości benzenu i strącono *n*-heksanem. Osad odwirowano i osuszono, pożądaną produkt **336** otrzymano w postaci czerwono-fioletowego proszku (5 mg, 35%).  $R_f = 0.24$  ( $SiO_2$  toluen/MeOH, 10%). Anal. elem. obliczono dla  $C_{47}H_{63}CoN_6O_{10} + 2H_2O$ : C 58.38, H 6.98, N 8.69; otrzymano: C 58.72, H 6.87, N 8.31. HRMS ESI ( $m/z$ ) obliczono dla  $C_{46}H_{63}CoN_5O_{10} [M-CN]^+$  904.3907; otrzymano: 904.3911. UV/Vis,  $\lambda$  ( $\epsilon$ ,  $M^{-1} \times cm^{-1}$ ): 276 ( $7.23 \times 10^3$ ), 313 ( $6.55 \times 10^3$ ), 370 ( $1.83 \times 10^4$ ), 546 ( $6.04 \times 10^3$ ), 586 ( $7.29 \times 10^3$ ) nm.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $C_6D_6$ )  $\delta$ : 5.36 (s, 0.6H), 5.32 (s, 0.4H), 4.0-3.9 (m, 2H), 3.76 (d,  $J = 8.5$  Hz, 0.6H), 3.69 (d,  $J = 7.9$  Hz, 0.4H), 3.43-3.03 (m, 15H), 2.9-2.6 (m, 6H), 2.6-2.3 (m, 9H), 2.26-1.73

(m, 12H), 2.23 (s, 3H), 1.51 (s, 1.7H), 1.48 (s, 1.3H), 1.18-0.89 (m, 12H), 0.79 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1.7H), 0.72 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1.3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$ : 176.32, 176.29, 175.3, 175.1, 173.9, 173.8, 173.7, 173.5, 172.89, 172.86, 172.41, 172.37, 172.2, 172.1, 171.8, 171.7, 170.2, 170.0, 165.7, 165.5, 163.9, 163.7, 102.7, 102.6, 102.4, 102.2, 90.2, 89.9, 82.6, 82.4, 76.0, 75.4, 58.5, 58.3, 57.2, 57.1, 53.9, 53.7, 51.7, 51.36, 51.35, 51.23, 51.21, 51.12, 51.09, 51.02, 50.96, 46.9, 46.6, 46.2, 42.4, 41.7, 41.4, 41.3, 40.0, 39.8, 36.3, 35.8, 34.2, 34.1, 33.6, 33.3, 32.0, 31.9, 31.2, 30.8, 30.7, 30.4, 30.1, 30.0, 26.1, 26.0, 24.8, 24.6, 22.6, 22.5, 19.8, 19.67, 19.66, 19.5, 18.7, 18.3, 16.8, 16.7, 16.0, 15.7, 15.5, 15.4 ppm.

## 6. Literatura

1. E. R. Derbyshire, M. A. Marletta, *Annu. Rev. Biochem.*, 2012, **81**, 533-559.
2. J. P. Stasch, P. Pacher, O. V. Evgenov, *Circulation*, 2011, **123**, 2263-2273.
3. I. Sharina, M. Sobolevsky, M.-F. Doursout, D. Gryko, E. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2012, **340**, 723-732.
4. B. Grüning, G. Holze, T. A. Jenny, P. Nesvadba, A. Gossauer, L. Ernst, W. S. Sheldrick, *Helv. Chim. Acta*, 1985, **68**, 1754-1770.
5. C.-M. Ho, J.-L. Zhang, C.-Y. Zhou, O.-Y. Chan, J. J. Yan, F.-Y. Zhang, J.-S. Huang, C.-M. Che, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 1886-1894.
6. K. Tahara, Y. Hisaeda, *Green Chem.*, 2011, **13**, 558-561.
7. K. E. Broderick, P. Potluri, S. Zhuang, I. E. Scheffler, V. S. Sharma, R. B. Pilz, G. R. Boss, *Exp. Biol. Med.*, 2006, **231**, 641-649.
8. D. Monti, S. Nardis, M. Stefanelli, R. Paolesse, C. Di Natale, A. Amico, *Journal of Sensors*, 2009, 1-9.
9. J. Shi, T. W. B. Liu, J. Chen, D. Green, D. Jaffray, B. C. Wilson, F. Wang, G. Zheng, *Theranostics* 2011, **1**, 363-370.
10. J.-H. Chou, M. E. Kosal, H. S. Nalwa, N. A. Rakow, K. S. Suslick, *The Porphyrin Handbook*, ed. K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, Academic Press, 2000, vol. 6 Application: Past, Present and Future, 43-131.
11. M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi, R. K. Pandey, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 340-362.
12. H. Nakamura, M. Kirihata, *Neutron Capture Therapy*, ed. W. Sauerwein, A. Wittig, R. Moss, Y. Nakagawa, Springer Berlin Heidelberg, 2012, 99-116.
13. F. H. Zelder, C. Männel-Croisé, *CHIMIA*, 2009, **63**, 58-62.
14. C. A. Roessner, P. J. Santander, A. I. Scott, *Vitam. Horm.*, 2001, **61**, 267-297.
15. E. Deery, S. Schroeder, A. D. Lawrence, S. L. Taylor, A. Seyedarabi, J. Waterman, K. S. Wilson, D. Brown, M. A. Geeves, M. J. Howard, R. W. Pickersgill, M. J. Warren, *Nat. Chem. Biol.*, 2012, **8**, 933-940.
16. J.-R. Alonso, F. Cardellach, S. López, J. Casademont, Ò. Miró, *Pharmacol. Toxicol.*, 2003, **93**, 142-146.
17. S. I. Baskin, T. G. Brewer, F. Sidell, E. T. Takafuji, D. R. Franz, *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*, 1997.
18. *Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2007.
19. J. D. Pritchard, *HPA Compendium of Chemical Hazards Hydrogen cyanide*, Public Health England, Health Protection Agency, England, 2011.
20. Z. Wardaszka, A. Niemcunowicz-Janica, J. Janica, E. Koc-Żórawska, *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 2005, **LV**, 130-133.
21. G. Padmaja, *Crit. Rev. Food Sci.*, 1995, **35**, 299-339.
22. S. Powell, *Anal. Chem.*, 2009, 9535.
23. Z. Xu, X. Chen, H. N. Kim, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 127-137.
24. J. Ma, P. K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **673**, 117-125.
25. B. A. Logue, D. M. Hinkens, S. I. Baskin, G. A. Rockwood, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2010, **40**, 122-147.
26. K. E. Broderick, V. Singh, S. Zhuang, A. Kambo, J. C. Chen, V. S. Sharma, R. B. Pilz, G. R. Boss, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 8678-8685.
27. P. Renz, *Method. Enzymol.*, ed. B. M. Donald, D. W. Lemuel, Academic Press, 1971, vol. 18, Part C, 82-92.
28. W. C. Blackledge, C. W. Blackledge, A. Griesel, S. B. Mahon, M. Brenner, R. B. Pilz, G. R. Boss, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 4216-4221.

29. M. S. A. Hamza, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **69**, 269-274.
30. R. A. Firth, H. A. O. Hill, J. M. Pratt, R. G. Thorp, *J. Chem. Soc. A*, 1968, 453-456.
31. A. Chan, S. Balasubramanian, W. Blackledge, O. Mohammad, L. Alvarez, G. B. Boss, T. D. Bigby, *Clin. Toxicol.*, 2010, **48**, 709-717.
32. J. Lee, O. Mohammad, M. Brenner, S. B. Mahon, V. S. Sharma, J. Kim, D. Mukai, W. Blackledge, G. R. Boss, S. Goodman, K. A. Kreuter, R. Ahdout, *J. Biomed. Opt.*, 2010, **15**, 17001-17008.
33. F. H. Zelder, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 2008, **47**, 1264-1266.
34. J. Ma, P. K. Dasgupta, F. H. Zelder, G. R. Boss, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **736**, 78-84.
35. L. Werthemann, Rozprawa doktorska No. 4097, ETH, Zürich, 1968.
36. Y. Murakami, Y. Hisaeda, A. Kajihara, *B. Chem. Soc. Jpn.*, 1983, **56**, 3642-3646.
37. C. Männel-Croisé, B. Probst, F. H. Zelder, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 9493-9498.
38. C. Männel-Croisé, F. H. Zelder, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2012, **4**, 725-729.
39. C. Mannel-Croisé, F. H. Zelder, *Anal. Methods*, 2012, **4**, 2632-2634.
40. S. S. M. Hassan, M. S. A. Hamza, A. E. Kelany, *Talanta*, 2007, **71**, 1088-1095.
41. S. Izumi, H. Shimakoshi, M. Abe, Y. Hisaeda, *Dalton T.*, 2010, **39**, 3302-3307.
42. C. Männel-Croisé, F. H. Zelder, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 1272-1274.
43. S. Pervaiz, M. Olivo, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2006, **33**, 551-556.
44. C. S. Nayak, *Indian J. Dermatol. Venerol. Leprol.*, 2005, **71**, 155-160.
45. H. von Tappeiner, H. Jesionek, *Munchen. Med. Wochen.*, 1903, **47**, 2042-2044.
46. H. A. von Tappeiner, A. Jodlbauer, *Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung.*, F. C. W. Vogel, Leipzig, Germany, 1907.
47. M. O. Senge, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2012, **9**, 170-179.
48. E. D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brückner, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 4151-4202.
49. L. B. Josefsen, R. W. Boyle, *Brit. J. Pharmacol.*, 2008, **154**, 1-3.
50. A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, A. T. Byrne, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 1053-1074.
51. D. Kessel, C. J. Dutton, *Photochem. Photobiol.*, 1984, **40**, 403-405.
52. A. F. Mironov, A. N. Kozyrev, A. S. Brandis, *Materiały konferencyjne: Laser Study of Macroscopic Biosystems, 17.06.1993, Jyväskylä, Finlandia*, 1993, **1922**, 204-208.
53. J. F. Lovell, T. W. B. Liu, J. Chen, G. Zheng, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2839-2857.
54. A. J. Bullous, C. M. A. Alonso, R. W. Boyle, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, **10**, 721-750.
55. J. S. Cavaleiro, J. C. Tomé, M. F. Faustino, *Heterocycles from Carbohydrate Precursors*, ed. E. Ashry, Springer Berlin Heidelberg, 2007, vol. 7, 179-248.
56. G. J. Deok-Keun Han, Bong Young Chung, Young Key Shim, *B. Kor. Chem. Soc.*, 1999, **20**, 137-138.
57. L. G. Arnaut, *Advances in Inorganic Chemistry*, ed. R. v. Eldik, G. Stochel, Academic Press, 2011, vol. 63, 187-233.
58. F. Giuntini, C. M. A. Alonso, R. W. Boyle, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, **10**, 759-791.
59. H. Fischer, H. Orth, *Die chemie des Pyrrols*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1937.
60. H. Fischer, *Chem. Rev.*, 1937, **20**, 41-68.
61. V. Y. Pavlov, G. V. Ponomarev, *Chem. Heterocyc. Compd.*, 2004, **40**, 393-425.
62. O. N. Koifman, K. A. Askarov, B. D. Berezin, N. S. Enikolopyan, *Porphyrins: Structure, Properties, Synthesis.*, ed. N. S. Enikolopyan, Nauka, Moskwa, 1985, 178-180.
63. K. M. Smith, D. A. Goff, D. J. Simpson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 4946-4954.



64. G. Zheng, W. R. Potter, S. H. Camacho, J. R. Missert, G. Wang, D. A. Bellnier, B. W. Henderson, M. A. J. Rodgers, T. J. Dougherty, R. K. Pandey, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 1540-1559.
65. J. D. Glickson, X. Intes, B. Chance, Y. Chen, G. Zheng, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2004, **8**, 1106-1117.
66. M. Zhang, Z. Zhang, D. Blessington, H. Li, T. M. Busch, V. Madrak, J. Miles, B. Chance, J. D. Glickson, G. Zheng, *Bioconjugate Chem.*, 2003, **14**, 709-714.
67. S. K. Pandey, X. Zheng, J. Morgan, J. R. Missert, T.-H. Liu, M. Shibata, D. A. Bellnier, A. R. Oseroff, B. W. Henderson, T. J. Dougherty, R. K. Pandey, *Mol. Pharmaceutics*, 2007, **4**, 448-464.
68. Y. Il, L. Jia Zhu, S. Young Key, *Clinical Endoscopy*, 2013, **46**.
69. A. A. Aksenova, Y. L. Sebyakin, A. F. Mironov, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2001, **27**, 145-150.
70. D. A. Bellnier, W. R. Greco, G. M. Loewen, H. Nava, A. R. Oseroff, R. K. Pandey, T. Tsuchida, T. J. Dougherty, *Cancer Res.*, 2003, **63**, 1806-1813.
71. X. Zheng, J. Morgan, S. K. Pandey, Y. Chen, E. Tracy, H. Baumann, J. R. Missert, C. Batt, J. Jackson, D. A. Bellnier, B. W. Henderson, R. K. Pandey, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 4306-4318.
72. G. Zheng, A. Graham, M. Shibata, J. R. Missert, A. R. Oseroff, T. J. Dougherty, R. K. Pandey, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 8709-8716.
73. G. Zheng, H. Li, M. Zhang, S. Lund-Katz, B. Chance, J. D. Glickson, *Bioconjugate Chem.*, 2002, **13**, 392-396.
74. H. Jin, J. Chen, J. F. Lovell, Z. Zhang, G. Zheng, *Isr. J. Chem.*, 2012, **52**, 715-727.
75. B. A. Allison, E. Waterfield, A. M. Richter, J. G. Levy, *Photochem. Photobiol.*, 1991, **54**, 709-715.
76. U. Schmidt-Erfurth, H. Diddens, R. Birngruber, T. Hasan, *Br. J. Cancer*, 1997, **75**, 54-61.
77. M. Krieger, *Method. Enzymol.*, 1986, **128**, 608-613.
78. I. F. Craig, D. P. Via, W. W. Mantulin, H. J. Pownall, A. M. Gotto, L. C. Smith, *J. Lipid Res.*, 1981, **22**, 687-696.
79. D. E. Marotta, W. Cao, E. P. Wileyto, H. Li, I. Corbin, E. Rickter, J. D. Glickson, B. Chance, G. Zheng, T. M. Busch, *Nanomedicine*, 2011, **6**, 475-487.
80. W. Cao, K. K. Ng, I. Corbin, Z. Zhang, L. Ding, J. Chen, G. Zheng, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 2023-2031.
81. Irina A. Nikolaeva, Julia V. Morozova, Maria G. Zavialova, Roman A. Novikov, Yaroslav V. Tkachev, Vladimir P. Timofeev, Alexander Yu. Misharin, G. V. Ponomareva, *Macroheterocycles*, 2010, **3**, 150-156.
82. G. V. Ponomarev, M. N. Solovieva, N. O. Dugin, M. G. Zavialova, A. R. Mehtiev, A. Y. Misharin, R. A. Novikov, Y. V. Tkachev, V. I. Popenko, V. P. Timofeev, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 5420-5427.
83. S. Batzri, E. D. Korn, *BBA - Biomembranes*, 1973, **298**, 1015-1019.
84. N. El-Akra, A. Noiro, J.-C. Faye, J.-P. Souchard, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, **5**, 996-999.
85. S. Sadler, K. S. Persons, G. B. Jones, R. Ray, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 4638-4641.
86. N. Swamy, A. Purohit, A. Fernandez-Gacio, G. B. Jones, R. Ray, *J. Cell. Biochem.*, 2006, **99**, 966-977.
87. Y. Chen, A. Gryshuk, S. Achilefu, T. Ohulchansky, W. Potter, T. Zhong, J. Morgan, B. Chance, P. N. Prasad, B. W. Henderson, A. Oseroff, R. K. Pandey, *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**, 1264-1274.

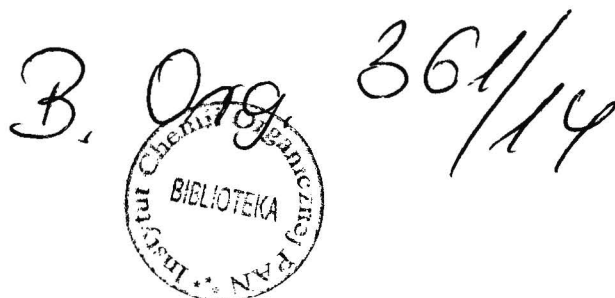
88. Y. Chen, K. Ohkubo, M. Zhang, E. Wenbo, W. Liu, S. K. Pandey, M. Ciesielski, H. Baumann, T. Erin, S. Fukuzumi, K. M. Kadish, R. Fenstermaker, A. Oseroff, R. K. Pandey, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**, 1257-1267.
89. O. T. James NS, Chen Y, Joshi P, Zheng X, Goswami LN, Pandey RK., *Theranostics* 2013, **3**, 703-718.
90. M. P. A. Williams, M. Ethirajan, K. Ohkubo, P. Chen, P. Pera, J. Morgan, W. H. White, M. Shibata, S. Fukuzumi, K. M. Kadish, R. K. Pandey, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 2283-2295.
91. M. Ethirajan, P. Joshi, W. H. William, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, R. K. Pandey, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 1956-1959.
92. M. Ethirajan, P. Chen, T. Y. Ohulchanskyy, L. N. Goswami, A. Gupta, A. Srivatsan, M. P. Dobhal, J. R. Missert, P. N. Prasad, K. M. Kadish, R. K. Pandey, *Chem. Eur. J.*, 2013, **19**, 6670-6684.
93. G. Li, A. Slansky, M. P. Dobhal, L. N. Goswami, A. Graham, Y. Chen, P. Kanter, R. A. Alberico, J. Spornyak, J. Morgan, R. Mazurchuk, A. Oseroff, Z. Grossman, R. K. Pandey, *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**, 32-42.
94. L. N. Goswami, W. H. White, J. A. Spornyak, M. Ethirajan, Y. Chen, J. R. Missert, J. Morgan, R. Mazurchuk, R. K. Pandey, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 816-827.
95. J. A. Spornyak, W. H. White, M. Ethirajan, N. J. Patel, L. Goswami, Y. Chen, S. Turowski, J. R. Missert, C. Batt, R. Mazurchuk, R. K. Pandey, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 828-835.
96. T. Itoh, A. Ishii, Y. Kodera, M. Hiroto, A. Matsushima, H. Nishimura, Y. Inada, *Res. Chem. Intermediat.*, 1996, **22**, 129-136.
97. V. Rapozzi, M. Zacchigna, S. Biffi, C. Garrovo, F. Cateni, M. Stebel, S. Zorzet, G. M. Bonora, S. Drioli, L. Xodo, *Cancer Biol. Ther.*, 2010, **10**, 471-482.
98. V. Rapozzi, S. Zorzet, M. Zacchigna, S. Drioli, L. Xodo, *Invest. New Drug.*, 2013, **31**, 192-199.
99. A. F. Gacio, C. Fernandez-Marcos, N. Swamy, D. Dunn, R. Ray, *J. Cell. Biochem.*, 2006, **99**, 665-670.
100. H. You, H.-E. Yoon, J.-H. Yoon, H. Ko, Y.-C. Kim, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 5383-5391.
101. Y. K. Rong P, Srivastan A, Kiesewetter DO, Yue X, Wang F, Nie L, Bhirde A, Wang Z, Liu Z, Niu G, Wang W, Chen X, *Theranostics* 2014, **4**, 229-239.
102. Y. K. Shim, G.-I. Sengee, N. Badraa, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2009, **13**, 818-822.
103. A. Parihar, A. Dube, P. K. Gupta, *Cancer Chemoth. Pharm.*, 2011, **68**, 359-369.
104. T. B. Liu, J. Chen, G. Zheng, *Amino Acids*, 2011, **41**, 1123-1134.
105. J. F. Lovell, J. Chen, M. T. Jarvi, W.-G. Cao, A. D. Allen, Y. Liu, T. T. Tidwell, B. C. Wilson, G. Zheng, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 3203-3211.
106. J. Chen, J. F. Lovell, P.-C. Lo, K. Stefflova, M. Niedre, B. C. Wilson, G. Zheng, *Photochem. Photobiol.*, 2008, **7**, 775-781.
107. L. Costa, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, Â. Cunha, A. Almeida, *Viruses*, 2012, **4**, 1034-1074.
108. A. Almeida, A. Cunha, M. A. F. Faustino, A. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens*, ed. Michael R. Hamblin, Giulio Jori, RSC, London, 2011, 83-160.
109. C. M. Cassidy, M. M. Tunney, P. A. McCarron, R. F. Donnelly, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2009, **95**, 71-80.
110. R. F. Donnelly, P. A. McCarron, M. M. Tunney, *Microbiol. Res.*, 2008, **163**, 1-12.

111. S. A. G. Lambrechts, M. C. G. Aalders, J. Van Marle, *Antimicrob. Agents Ch.*, 2005, **49**, 2026-2034.
112. N. S. Soukos, M. R. Hamblin, T. Hasan, *Photochem. Photobiol.*, 1997, **65**, 723-729.
113. N. S. Soukos, L. A. Ximenez-Fyvie, M. R. Hamblin, S. S. Socransky, T. Hasan, *Antimicrob. Agents Ch.*, 1998, **42**, 2595-2601.
114. G. P. Tegos, M. Anbe, C. Yang, T. N. Demidova, M. Satti, P. Mroz, S. Janjua, F. Gad, M. R. Hamblin, *Antimicrob. Agents Ch.*, 2006, **50**, 1402-1410.
115. B. B. Fuchs, G. P. Tegos, M. R. Hamblin, E. Mylonakis, *Antimicrob. Agents Ch.*, 2007, **51**, 2929-2936.
116. H. Ali, J. E. van Lier, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2379-2450.
117. V. Y. Pavlov, *Russ. J. Org. Chem.*, 2007, **43**, 1-34.
118. C. Lottner, R. Knuechel, G. Bernhardt, H. Brunner, *Cancer Lett.*, 2004, **203**, 171-180.
119. H. Brunner, M. R. Arndt, B. Treitinger, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, **357**, 1649-1669.
120. H. Brunner, K. M. Schellerer, *Inorg. Chim. Acta*, 2003, **350**, 39-48.
121. C. Lottner, K.-C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2064-2078.
122. H. Brunner, K.-M. Schellerer, *Z. Naturforsch.*, 2002, **57b**, 751-756.
123. V. I. Bregadze, I. B. Sivaev, D. Gabel, D. Wöhrle, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2001, **5**, 767-781.
124. I. B. Sivaev, V. V. Bregadze, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, **2009**, 1433-1450.
125. M. F. Hawthorne, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1993, **32**, 950-984.
126. R. Barth, M. G. H. Vicente, O. Harling, W. Kiger, K. Riley, P. Binns, F. Wagner, M. Suzuki, T. Aihara, I. Kato, S. Kawabata, *Radiat. Oncol.*, 2012, **7**, 146-167.
127. A. H. Soloway, W. Tjarks, B. A. Barnum, F. G. Rong, R. F. Barth, I. M. Codogni, J. G. Wilson, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1515-1562.
128. Mikhail A. Grin, Dmitry I. Brittal, Aleksander G. Tsiprovskiy, Vladimir I. Bregadze, A. F. Mironova, *Macroheterocycles*, 2010, **3**, 222-227.
129. V. I. Bregadze, I. B. Sivaev, I. A. Lobanova, R. A. Titeev, D. I. Brittal, M. A. Grin, A. F. Mironov, *Appl. Radiat. Isotopes*, 2009, **67**, S101-S104.
130. M. A. Grin, A. F. Mironov, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2008, **12**, 1163-1172.
131. M. A. Grin, R. A. Titeev, D. I. Brittal, O. V. Ulybina, A. G. Tsiprovskiy, M. Y. Berzina, I. A. Lobanova, I. B. Sivaev, V. I. Bregadze, A. F. Mironov, *Mendeleev Commun.*, 2011, **21**, 84-86.
132. V. I. Bregadze, A. A. Semioshkin, J. N. Las'kova, M. Y. Berzina, I. A. Lobanova, I. B. Sivaev, M. A. Grin, R. A. Titeev, D. I. Brittal, O. V. Ulybina, A. V. Chestnova, A. A. Ignatova, A. V. Feofanov, A. F. Mironov, *Appl. Organomet. Chem.*, 2009, **23**, 370-374.
133. A. V. Orlova, N. N. Kondakov, B. G. Kimel, L. O. Kononov, E. G. Kononova, I. B. Sivaev, V. I. Bregadze, *Appl. Organomet. Chem.*, 2007, **21**, 98-100.
134. M. A. Grin, R. A. Titeev, D. I. Brittal, A. V. Chestnova, A. V. Feofanov, I. A. Lobanova, I. B. Sivaev, V. I. Bregadze, A. F. Mironov, *Russ. Chem. B.*, 2010, **59**, 219-224.
135. M. Miura, D. Gabel, G. Oenbrink, R. G. Fairchild, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 2247-2250.
136. S. B. Kahl, M. S. Koo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1990, 1769-1771.
137. S. B. Kahl, J. J. Schaeck, M.-S. Koo, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 1875-1880.
138. P. Clezy, C. Fookes, *Aust. J. Chem.*, 1980, **33**, 575-583.
139. M. A. Dagrosa, L. Thomasz, J. Longhino, M. Perona, O. Calzetta, H. Blaumann, R. J. Rebagliati, R. Cabrini, S. Kahl, G. J. Juvenal, M. A. Pisarev, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2007, **69**, 1059-1066.
140. M. F. Isaac, S. B. Kahl, *J. Organomet. Chem.*, 2003, **680**, 232-243.

141. R. K. Pandey, K. M. Smith, T. J. Dougherty, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 2032-2038.
142. A. S. Phadke, A. R. Morgan, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 1725-1728.
143. M. E. El-Zaria, H. S. Ban, H. Nakamura, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 1543-1552.
144. O. V. Evgenov, P. Pacher, P. M. Schmidt, G. Hasko, H. H. H. W. Schmidt, J.-P. Stasch, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, **5**, 755-768.
145. K. ó Proinsias, M. Giedyk, I. G. Sharina, E. Martin, D. Gryko, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 476-479.
146. K. ó Proinsias, M. Giedyk, Ł. Banach, D. Rutkowska-Zbik, D. Gryko, *Asian J. Org. Chem.*, 2013, **2**, 504-513.
147. K. ó Proinsias, D. T. Gryko, Y. Hisaeda, E. Martin, J. L. Sessler, D. Gryko, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 8943-8947.
148. M. Chromiński, K. ó Proinsias, E. Martin, D. Gryko, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 1530-1537.
149. M. Chromiński, Ł. Banach, M. Karczewski, K. ó Proinsias, I. Sharina, D. Gryko, E. Martin, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 7260-7277.
150. A. Gossauer, K.-P. Heise, H. Götze, H. H. Inhoffen, *Liebigs Ann. Chem.*, 1977, **1977**, 1480-1499.
151. S. Trofimenko, J. C. Calabrese, J. K. Kochi, S. Wolowiec, F. B. Hulsbergen, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 3943-3950.
152. K. o Proinsias, M. Giedyk, D. Gryko, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6605-6619.
153. P. M. Pathare, D. S. Wilbur, S. Heusser, E. V. Quadros, P. McLoughlin, A. C. Morgan, *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 217-232.
154. D. R. van Staveren, R. Waibel, S. Mundwiler, P. A. Schubiger, R. Alberto, *J. Organomet. Chem.*, 2004, **689**, 4803-4810.
155. M. J. Pfammatter, T. Darbre, R. Keese, *Helv. Chim. Acta*, 1998, **81**, 1105-1116.
156. H. Shimakoshi, M. Tokunaga, K. Kuroiwa, N. Kimizuka, Y. Hisaeda, *Chem. Commun.*, 2004, 50-51.
157. T. Högberg, R. Ström, M. Ebner, S. Råmsby, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 2033-2036.
158. P. Basabe, A. Blanco, O. Boderó, M. Martín, I. S. Marcos, D. Díez, F. Mollinedo, J. G. Urones, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 2422.
159. P. E. Reyes-Gutiérrez, R. O. Torres-Ochoa, R. Martínez, L. D. Miranda, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 1388-1396.
160. A. Fürstner, O. Guth, A. Rumbo, G. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 11108-11113.
161. Y. Hisaeda, A. Ogawa, T. Ohno, Y. Murakami, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **273**, 299-309.
162. C. Bolm, I. Schiffrers, C. L. Dinter, A. Gerlach, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 6984-6991.
163. K. ó Proinsias, M. Giedyk, R. Loska, M. Chromiński, D. Gryko, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 6806-6812.
164. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 606-631.
165. B. Alcaide, P. Almendros, C. Aragoncillo, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4437-4492.
166. A. A. Taubinger, D. Fenske, J. Podlech, *Tetrahedron* 2008, 8659-8667.
167. C. Palomo, J. M. Aizpurua, C. Cuevas, *J. Chem. Soc.*, 1994, 1957-1958.
168. C. Palomo, J. M. Aizpurua, A. Mielgo, *Chem. Commun.*, 1996, 633-634.
169. C. Palomo, J. M. Aizpurua, C. Cuevas, A. Mielgo, R. Galarza, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 9027-9030.
170. M. Schilz, H. Plenio, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 2798-2807.
171. D. Koszelewski, A. Nowak-Król, M. Drobizhev, C. J. Wilson, J. E. Haley, T. M. Cooper, J. Romiszewski, E. Górecka, H. L. Anderson, A. Rebane, D. T. Gryko, *J. Mater. Chem. C*, 2013, **1**, 2044-2053.
172. F. Zhou, Y. Feng, B. Zhang, *Res. Chem. Intermediat.*, 2014, **40**, 1517-1524.

173. T. Tanaka, A. Osuka, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, DOI: 10.1039/c3cs60443h.
174. A. J. Markwell, J. M. Pratt, M. S. Shaikjee, J. G. Toerien, *J. Chem. Soc. Dalton*, 1987, 1349-1357.
175. M. Chrominski, A. Lewalska, D. Gryko, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 11406-11408.
176. N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.*, 1995, **95**, 2457-2483.
177. J. K. Stille, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1986, **25**, 508-524.
178. K. Tamao, S. Kodama, I. Nakajima, M. Kumada, A. Minato, K. Suzuki, *Tetrahedron*, 1982, **38**, 3347-3354.
179. E. Negishi, A. O. King, N. Okukado, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 1821-1823.
180. L. Ackermann, R. Vicente, A. R. Kapdi, *Angew. Chem Int. Ed.*, 2009, **48**, 9792-9826.
181. F. Bellina, F. Benelli, R. Rossi, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 5529-5535.
182. J.-P. Leclerc, K. Fagnou, *Angew. Chem Int. Ed.*, 2006, **45**, 7781-7786.
183. L.-C. Campeau, M. Parisien, M. Leblanc, K. Fagnou, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 9186-9187.
184. S. I. Gorelsky, D. Lapointe, K. Fagnou, *J. Org. Chem.*, 2011, **77**, 658-668.
185. B. Glover, K. A. Harvey, B. Liu, M. J. Sharp, M. F. Tymoschenko, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 301-304.
186. C.-H. Park, V. Ryabova, I. V. Seregin, A. W. Sromek, V. Gevorgyan, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 1159-1162.
187. J. M. Quimby, L. T. Scott, *Adv. Synth. Catal.*, 2009, **351**, 1009-1013.
188. K. Kobayashi, A. Sugie, M. Takahashi, K. Masui, A. Mori, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 5083-5085.
189. N. R. Deprez, D. Kalyani, A. Krause, M. S. Sanford, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 4972-4973.
190. T. W. Lyons, M. S. Sanford, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 1147-1169.
191. C.-L. Ciana, R. J. Phipps, J. R. Brandt, F.-M. Meyer, M. J. Gaunt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 458-462.
192. R. J. Phipps, N. P. Grimster, M. J. Gaunt, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8172-8174.
193. J. Wen, R.-Y. Zhang, S.-Y. Chen, J. Zhang, X.-Q. Yu, *J. Org. Chem.*, 2011, **77**, 766-771.
194. N. Lebrasseur, I. Larrosa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 2926-2927.
195. K. Zhou, F. H. Zelder, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 11999-12001.
196. L. Ernst, G. Holze, H. H. Inhoffen, *Liebigs Ann. Chem.*, 1981, 198-201.
197. H. Maag, Rozprawa doktorska No. 5173, ETH, Zürich, 1973.
198. R. Battino, T. R. Rettich, T. Tominaga, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 1983, **12**, 163-178.
199. J. M. Achord, C. L. Hussey, *Anal. Chem.*, 1980, **52**, 601-602.
200. S. M. Chemaly, K. L. Brown, M. A. Fernandes, O. Q. Munro, C. Grimmer, H. M. Marques, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 8700-8718.
201. H. Okumoto, T. Jinnai, H. Shimizu, Y. Harada, H. Mishima, A. Suzuki, *Synlett*, 2000, 629-630.
202. T. Seiser, N. Cramer, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2835-2840.
203. T. Satoh, M. Miura, *Directed Metallation*, ed. N. Chatani, Springer Berlin Heidelberg, 2007, vol. 24, 61-84.
204. Y. Terao, H. Wakui, M. Nomoto, T. Satoh, M. Miura, M. Nomura, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 5236-5243.
205. Y. Terao, H. Wakui, T. Satoh, M. Miura, M. Nomura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 10407-10408.
206. B. Kräutler, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 9032-9045.
207. S. A. Galema, *Chem. Soc. Rev.*, 1997, **26**, 233-238.
208. A. de la Hoz, A. Diaz-Ortiz, A. Moreno, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, **34**, 164-178.

209. L. Favretto, *Basic Guidelines for Microwave Organic Chemistry Applications*, Milestone Srl., Leipzig, 2004.
210. W. L. F. Armarego, C. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier Science, 2009.
211. D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, *Synthesis*, 2001, 2431-2434.
212. K. L. Brown, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 2075-2150.
213. J. Banville, A. Marinier, Y. Gai, S. Plamondon, S. Roy, N. Balasubramanian, *US Pat.*, 2002, **US2002065246 (A1)**.
214. J. Regourd, A. Al-Sheikh Ali, A. Thompson, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 1528-1536.
215. P. A. Aristoff, P. D. Johnson, A. W. Harrison, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 5341-5348.
216. T. L. Gresham, J. E. Jansen, F. W. Shaver, J. T. Gregory, W. L. Beears, *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 1004-1006.



Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

**O-B.361/14**



**9000000187551**