

mgr inż. Liwia Lebelt

**Fosfonianowe analogi kwasów
amino(hydroksy)karboksylowych
o potencjalnej aktywności biologicznej**

Praca wykonana
w Zakładzie Chemii Bioorganicznej
Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

PROMOTOR:
Prof. dr hab. Dorota G. Piotrowska

Łódź 2023

Składam szczególnie serdeczne podziękowania Promotorowi niniejszej rozprawy Pani prof. Dorocie Piotrowskiej za wyrozumiałość, cenne wskazówki i wszechstronną pomoc podczas realizowania badań oraz pisania tej pracy.

Dziękuję również Pani prof. Iwonie Głowackiej za wszelkie wskazówki.

Wszystkim pracownikom Zakładu Chemii Bioorganicznej składam serdeczne podziękowania za stworzenie miłej i życzliwej atmosfery w pracy.

SPIS TREŚCI

Spis treści.....	5
Wykaz stosowanych skrótów	7
1. Wstęp.....	10
2. Część literaturowa.....	17
2.1. Wprowadzenie – kwas glutaminowy	18
2.2. Pochodne kwasu hydroksyglutaminowego w przyrodzie.....	19
2.3. Kwas 3-hydroksyglutaminowy	20
2.4. Kwas 4-hydroksyglutaminowy	38
3. Omówienie wyników badań	52
3.1. Założenia projektu i plan pracy	52
3.2. Synteza nitronu (<i>S</i>)- <i>N</i> -(1-feniloetylo)- <i>C</i> -(dietoksyfosforylo)nitronu (<i>S</i>)- 164	55
3.3. Synteza 1-(<i>tert</i> -butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylfosfonianu dietylu (<i>R</i>)- 163 i (<i>S</i>)- 163	58
3.4. Synteza enancjomerów kwasu (1-amino-3-hydroksypropan-1,3-diylo)difosfonowego (<i>1R,3S</i>)- 24 , (<i>1S,3R</i>)- 24 , (<i>1R,3R</i>)- 24 ,(<i>1S,3S</i>)- 24 , (<i>1R,3S</i>)- 24a , (<i>1S,3R</i>)- 24a , (<i>1R,3R</i>)- 24a oraz (<i>1S,3S</i>)- 24a	61
3.5. Ustalenie konfiguracji absolutnej centrum stereogenicznego na atomie C3 w (1- <i>tert</i> - butoksykarbonyloamino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonianach tetraetylu (<i>1R,3S</i>)- 161 , (<i>1R,3R</i>)- 161 , (<i>1S,3R</i>)- 161 i (<i>1S,3S</i>)- 161	67
3.6. Synteza kwasów (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowych <i>mezo</i> - 25 , (<i>1R,3R</i>)- 25 , (<i>1S,3S</i>)- 25	72
3.7. Ustalenie konfiguracji absolutnej na atomie C3 w estrach kwasów (1-amino-3- hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych (<i>1R,3R</i>)- 162 , (<i>1R,3S</i>)- 162 , (<i>1S,3S</i>)- 162 i (<i>1S,3R</i>)- 162	78
3.8. Ocena aktywności biologicznej	79
4. Podsumowanie.....	82
5. Wnioski	85
6. Część eksperymentalna.....	88

6.1. Dane ogólne dotyczące syntezy związków	88
6.2. Synteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(1-feniloetylo)- <i>C</i> -(dietoksyfosforylo)nitronu (<i>S</i>)- 164	89
6.3. Synteza 1-(<i>tert</i> -butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylfosfonianów dietylu (<i>1R,3R</i>)- 163 i (<i>1S,3S</i>)- 163	92
6.4. Synteza [1-(<i>tert</i> -butoksykarbonyloamino)-3-hydroksypropano-1,3-dylo]difosfonianów tetraetylu (<i>1R,3S</i>)- 161 i (<i>1R,3R</i>)- 161 oraz (<i>1S,3R</i>)- 161 i (<i>1S,3S</i>)- 161	99
6.5. Synteza kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-dylo)difosfonowych (<i>1R,3S</i>)- 24 , (<i>1S,3R</i>)- 24 , (<i>1R,3R</i>)- 24 , (<i>1S,3S</i>)- 24 , (<i>1R,3S</i>)- 24a , (<i>1S,3R</i>)- 24a , (<i>1R,3R</i>)- 24a oraz (<i>1S,3S</i>)- 24a	106
6.6. Reakcja cykloaddycji nitronu 178 do winylofosfonianu	111
6.7. Synteza <i>O</i> -metylomigdałanów (<i>1R,3S,1'S</i>)- 181 , (<i>1R,3R,1'S</i>)- 181 , (<i>1S,3R,1'S</i>)- 181 , (<i>1S,3S,1'S</i>)- 181	114
6.8. Synteza (3-benzyloamino-1- <i>tert</i> -butoksykarbonyloaminopropano-1,3-dylo)difosfonianów tetraetylu (<i>1R,3R</i>)- 162 , (<i>1R,3S</i>)- 162 , (<i>1S,3S</i>)- 162 , (<i>1S,3R</i>)- 162	117
6.9. Synteza [1,3-bis(<i>tert</i> -butoksykarbonyloamino)propano-1,3-dylo]difosfonianu tetraetylu <i>mezo</i> - 183 , (<i>1R,3R</i>)- 183 oraz (<i>1S,3S</i>)- 183	122
6.10. Synteza dichlorowodorków kwasów (1,3-diaminopropano-1,3-dylo)difosfonowych <i>mezo</i> - 25 , (<i>1R,3R</i>)- 25 oraz (<i>1S,3S</i>)- 25	125
6.11. Ocena aktywności biologicznej	127
7. Literatura cytowana	130
8. Streszczenie	141
8.1. Streszczenie w języku polskim	141
8.2. Streszczenie w języku angielskim	143
Wykaz osiągnięć naukowych	144

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ac	grupa acetylowa
Ac ₂ O	bezwodnik octowy
AIBN	2-(2-cyjanopropan-2-ylodiazonylo)-2-metylopropanonitril
AIDS	zespół nabytego niedoboru odporności
AMPA	kwasy α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
AP5	kwasy 2-amino-5-fosfonopentanowy
AP7	kwasy 2-amino-7-fosfonoheptanowy
APCPr	kwasy (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-amino-2-(fosfonometylo)cyklopropanokarboksyłowy
Bn	grupa benzylowa
Boc	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
Boc ₂ O	diwęglan di- <i>tert</i> -butylu
Bu	grupa butylowa
cAMP	cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan
CHO-K1	linia komórkowa pochodząca z jajnika chomika chińskiego
D(-)-DIPT	D-winian diizopropylu
DCC	<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DEAD	azodikarboksylan dietylu
DH	dysiherbaina
DMAP	4-dimetyloaminopirydyna
DMEM	medium do hodowli komórek (<i>ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMPT	demetylofosfinotrycyna
DMSO	dimetylosulfotlenek
d.e.	nadmiar diastereoizomeryczny (<i>ang. diastereomeric excess</i>)
d.r.	stosunek diastereoizomeryczny (<i>ang. diastereomeric ratio</i>)
EC ₅₀	efektywne stężenie substancji niezbędne do uzyskania 50% maksymalnej odpowiedzi
ED ₅₀	dawka substancji, która powoduje określone zmiany biologiczne lub kliniczne u 50% testowanych organizmów
Et	grupa etylowa
FBS	płodowa surowica bydlęca (<i>ang. Fetal Bovine Serum</i>)
HIV	ludzki wirus niedoboru odporności
Fmoc	grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
FSK	forskolina
GluA1	glutaminergiczny receptor jonotropowy typu AMPA 1
GluA2	glutaminergiczny receptor jonotropowy typu AMPA 2
GluK1	glutaminergiczny receptor jonotropowy typu KA 1
GluK2	glutaminergiczny receptor jonotropowy typu KA 2
GluK3	glutaminergiczny receptor jonotropowy typu KA 3
GluK5	glutaminergiczny receptor jonotropowy typu KA 5
GS	syntetaza glutaminowa

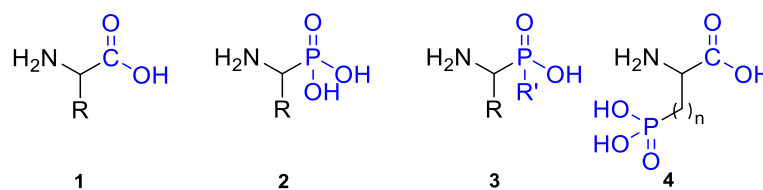
HEK293 Tet-on	linia ludzkich komórek embrionalnych pochodzenia nerkowego z ekspresją receptorów regulowaną za pomocą tetracykliny
HPLC	wysokosprawna/wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa
IC ₅₀	efektywne stężenie inhibitora wykazujące zmniejszenie maksymalnej odpowiedzi o połowę
iGluR	glutaminergiczny jonotropowy receptor
<i>i</i> -Pr	grupa izopropylowa
KA	kwaskainowy
KHMDS	heksametylodisilazan potasu
K _i	stała inhibicji
LAP4	kwask L-2-amino-4-fosfonobutanowy
LiHMDS	heksametylodisilazan litu
L-SOP	<i>O</i> -fosfono-L-seryna
LSP1-2093	kwask {[<i>(3S)</i> -3-amino-3-karboksy]propylo}{[<i>(3</i> -nitrofenylo)hydroksymetylo]fosfinowy
LSP1-2111	kwask {[<i>(3S)</i> -3-amino-3-karboksy]propylo}{[<i>(4</i> -hydroksy-5-metoksy-3-nitrofenylo)hydroksymetylo]fosfinowy
LSP1-3081	[<i>(3S)</i> -3-(3-amino-3-karboksypropyl(hydroksy)fosfinylo)-hydroksymetylo]-5-nitrotiofen
LSP4-2022	kwask {[<i>(3S)</i> -3-amino-3-karboksy]propylo}{[<i>(4</i> -(karboksymetoksy)fenylo)hydroksymetylo]fosfinowy
MAP4	kwask 4-metylo-4-fosfonobutanowy
MCPBA	kwask <i>m</i> -chloronadbenzoesowy
Me	grupa metylowa
mGluR	glutaminergiczny receptor metabotropowy
mGluR1	glutaminergiczny receptor metabotropowy typu 1
mGluR2	glutaminergiczny receptor metabotropowy typu 2
mGluR3	glutaminergiczny receptor metabotropowy typu 3
mGluR4	glutaminergiczny receptor metabotropowy typu 4
mGluR5	glutaminergiczny receptor metabotropowy typu 5
mGluR6	glutaminergiczny receptor metabotropowy typu 6
mGluR7	glutaminergiczny receptor metabotropowy typu 7
mGluR8	glutaminergiczny receptor metabotropowy typu 8
MIC	minimalne stężenie hamujące
MSOP	2-metylo- <i>O</i> -fosfono-L-seryna
MTT	ilościowe określenie aktywności cytotoksycznej za pomocą bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego
NDH	neodysiherbaina
NMDA	kwask <i>N</i> -metyloasparaginowy
okson	mononadsiarczan potasu (<i>ang.</i> <i>oxone</i>)
PCC	chlorochromian pirydyny
(<i>S</i>)-PCEP	kwask (<i>S</i>)-3-amino-3-karboksypropylo-2'-karboksyetylofosfinowy
PCG-1	<i>trans</i> -(2 <i>S</i> ,1' <i>R</i> ,2' <i>S</i>)-2-(2'-fosfonocyklopropylo)glicyna
PDC	dichromian pirydyny
Ph	grupa fenyłowa
Phth	grupa ftalimidowa

PPC	chlorochromian pirydyny
PPTS	<i>p</i> -toluenosulfonian pirydyny
PT	fosfotrycyna
PTSA	kwasy <i>p</i> -toluenosulfonowe
R _f	współczynnik opóźnienia
RP-HPLC	wysokociśnieniowa/wysokosprawna chromatografia ciekłowa w układzie faz odwróconych
SNB-75	linia komórek nowotworowych mózgu
SNB-78	linia komórek nowotworowych mózgu
t. p.	temperatura pokojowa
t. w.	temperatura wrzenia
TBAF	fluorek tetrabutylamoniumowy
TBHP	wodoronadtlenek <i>tert</i> -butylu
Tce	grupa trichloroetylowa
TEA	trietyloamina
TEMPO	(2,2,6,6-tetrametylopiperydyn-1-yl)oksyd
TFA	kwasy trifluorooctowe
TFE	trifluoroetanol
THF	tetrahydrofuran
L-tio-AP4	kwasy L-4-tiofosfonobutanowe
TMSI	jodek trimetylosililu
t _R	czas retencji
z-CPAP4	kwasy (<i>S</i>)- <i>cis</i> -cyklopropylo-2-amino-4-fosfonobutanowe

1. WSTĘP

1. WSTĘP

α -Aminokwasy **1** (rysunek 1) są jednymi z kluczowych cząsteczek w organizmach żywych. Oprócz ich fundamentalnej roli jako składników białek, aminokwasy cieszą się również dużym zainteresowaniem w syntezie organicznej, ponieważ mogą służyć jako chiralne bloki budulcowe do syntezy nowych związków o określonych właściwościach farmakologicznych, mogą także znaleźć zastosowanie w syntezie peptydów. Zidentyfikowano wiele aminokwasów niebiałkowych o interesujących właściwościach biologicznych, występują one m.in. jako fragmenty strukturalne złożonych produktów naturalnych. Prowadzone są również intensywne badania nad syntetycznymi analogami aminokwasów występujących w naturze. Szczególnym zainteresowaniem wśród analogów α -aminokwasów cieszą się fosfonowe analogi aminokwasów. Kwasy α -aminofosfonowe **2** i α -aminofosfinowe **3**, a także fosfono- i fosfinopeptydy **4**, jako analogi α -aminokwasów i odpowiednich peptydów, wykazują różnorodną aktywność biologiczną, w tym zdolność selektywnej inhibicji różnego rodzaju enzymów (rysunek 1).¹⁻⁴ Aktywność biologiczna fosfonianów wynika z podobieństwa do naturalnych substratów reakcji enzymatycznych. Dzięki temu związki te mogą konkurować z substratem posiadającym grupę karboksylową o centrum aktywne enzymu lub innego komórkowego receptora. Zastosowanie ugrupowania fosfonowego w miejsce grupy karboksylowej zostało z powodzeniem wykorzystane w projektowaniu nowych substancji o potencjalnych aktywnościach biologicznych.



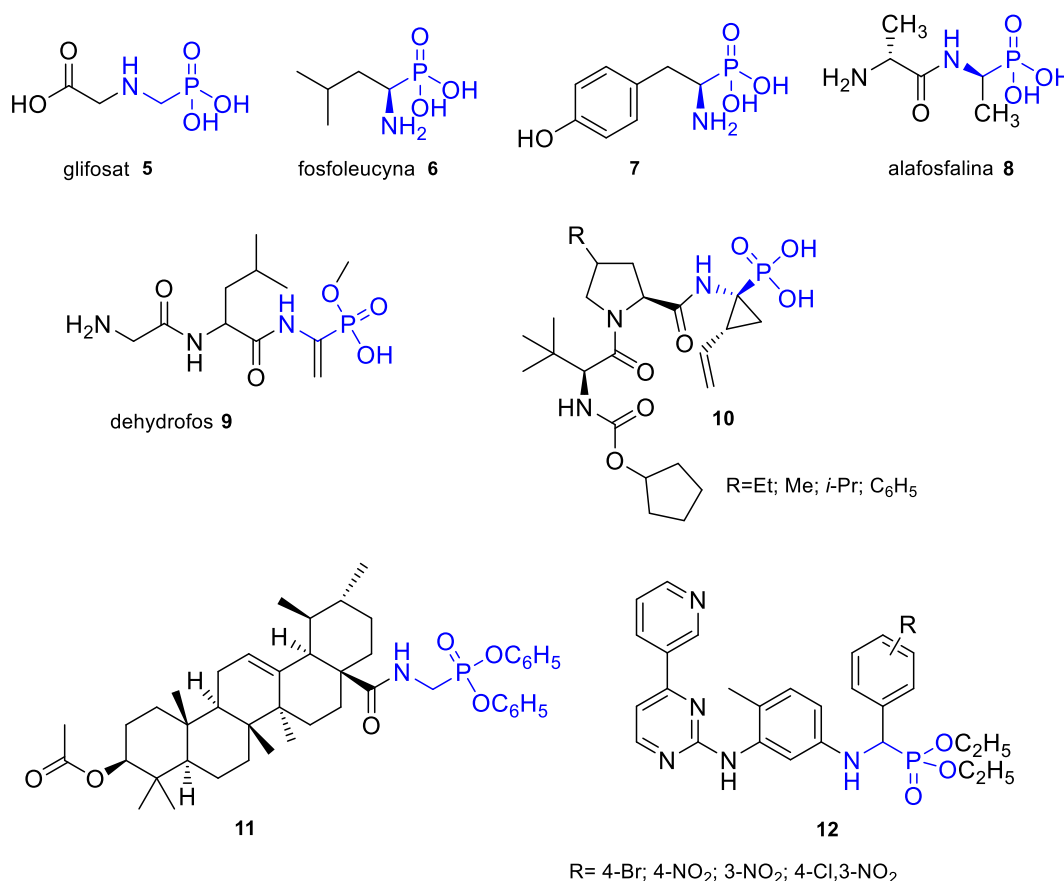
Rysunek 1. Ogólna struktura α -aminokwasów **1** oraz ich fosfonowych **2** i fosfinowych **3** pochodnych a także fosfonoaminokwasów **4**.

Jednymi z odkryć, które przyczyniły się do rozwoju badań nad tą grupą związków była izolacja ciliatyny, fosfonowego analogu β -alaniny, z materiału biologicznego uzyskanego z *Ciliated protozoa*⁵ oraz odkrycie pierwszego aminofosfonianowego inhibitora enzymu – syntetazy glutaminy. W literaturze opisano szereg właściwości biologicznych związków zawierających ugrupowanie fosfonowe, m.in. przeciwbakteryjne,

przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe i neuroprotektoryjne fosfonianowych analogów α -aminokwasów oraz ich aktywność jako pestycydów i regulatorów wzrostu roślin.^{6,7,8,9}

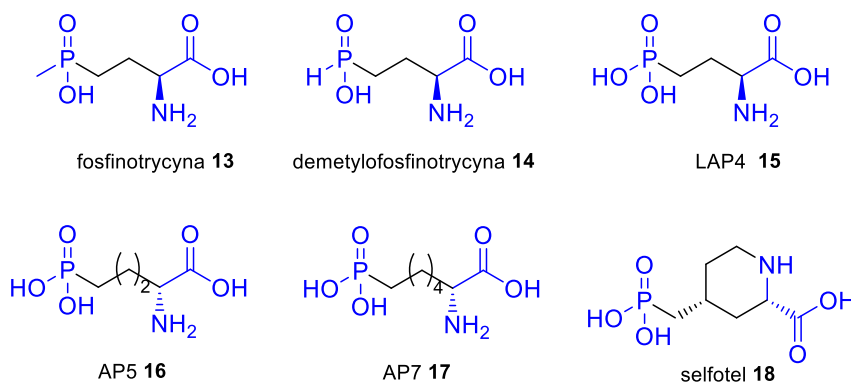
Do jednych z najczęściej stosowanych herbicydów należy glifosat **5** (rysunek 2). Jego działanie polega na hamowaniu syntazy 5-enolopirogroniano-szikimowo-3-fosforanowej, kluczowego enzymu na szlaku kwasu szikimowego. Ponadto, oprócz działania chwastobójczego hamuje także wzrost *Plasmodium falciparum*, pasożyta wywołującego malarię.⁶ Podobne działanie wykazywał również w przypadku pokrewnych typów jednokomórkowych pasożytów takich jak *Toxoplasma* i *Cryptosporidium*, które powodują oportunistyczne zakażenia u pacjentów z zespołem nabytego niedoboru odporności (AIDS).⁷ Fosfonowe analogi leucyny **6** i tyrozyny **7** (rysunek 2) są inhibitorami peptydazy leucyny, enzymu związanego z powstawaniem stanów zapalnych, a także chorobami nowotworowymi⁸ oraz zaciągą⁹, ponadto enzym ten odgrywa ważną rolę we wczesnych przypadkach zakażenia wirusem HIV.¹⁰

Dehydrofos **9** (rysunek 2) jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania produkowanym przez *Streptomyces luridus* działającym wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Acetylofosfonian metylu, produkt hydrolizy dehydrofosu **9**, jest silnym inhibitorem dehydrogenazy pirogronianowej.¹¹ Kolejnym aminoalkilofosfonianem o działaniu antybakteryjnym jest alafosfalina **8** (rysunek 2). Izomer (2'S,1R)-**8** wykazywał działanie przeciwbakteryjne skuteczniejsze niż pozostałe trzy izomery.¹² Podobną zależność można zaobserwować dla wcześniej wspomianej fosfoleucyny **6**, zauważono bowiem, że enancjomer *R* wykazywał wyższą aktywność w porównaniu z izomerem *S*.^{13,14} Fosfonowe pochodne związku **10** (rysunek 2) wykazywały działanie inhibicyjne wobec proteazy serynowej NS3 niezbędnej w replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C.¹⁵ Aktywność przeciwwirusową wykazywała także aminofosfonowa pochodna kwasu urosolowego **11** (rysunek 2) wobec ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV).¹⁶ Aminometylofosfonowe pochodne imatynibu **12** (rysunek 2), leku stosowanego w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej oraz ostrej białaczki limfoblastycznej, w testach MTT wykazywały lepsze właściwości przeciwnowotworowe w porównaniu z doksorubicyną i imatynibem.¹⁷



Rysunek 2. Przykłady aktywnych biologicznie fosfonowych pochodnych α -aminokwasów.

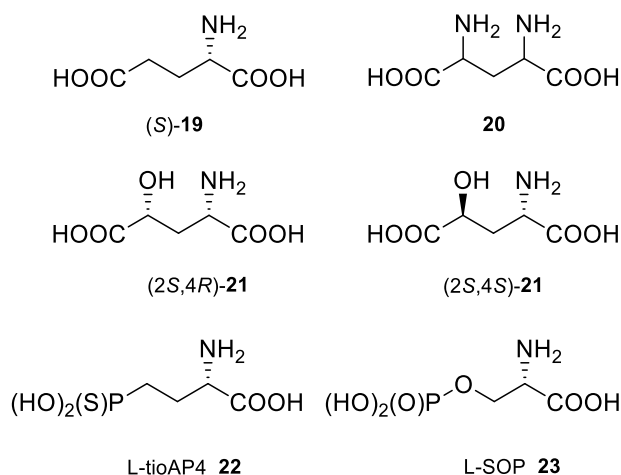
Inną ważną grupą związków wykazujących interesujące właściwości biologiczne są aminokwasy posiadające dodatkowe ugrupowanie fosfinowe lub fosfonowe (rysunek 3). Fosfinitrycyna **13** i demetylofosfinitrycyna **14** (rysunek 3), wyizolowane z promieniowca *Streptomyces hygroscopicus*^{18,19} oraz *Streptomyces viridochromogenes*²⁰ wykazywały działanie chwastobójcze ze względu na zdolność do inhibicji syntetazy glutaminowej. Związki **13** i **14** a także LAP4 **15** są analogami kwasu glutaminowego, głównego neuroprzekaźnika pobudzającego w centralnym układzie nerwowym i będącego nioselektywnym agonistą dla metabotropowych receptorów glutaminowych (mGluR). LAP4 **15** był pierwszym ligandem, który działał wybiórczo na III grupę mGluR, ale nie wykazywał selektywności pomiędzy podtypami receptorów metabotropowych tej grupy.²¹ Selektywność działania pochodnych **13-15** wobec III grupy receptorów mGluR wynikała z zastąpienia grupy karboksylowej bioizosterycznym ugrupowaniem fosfonowym (rysunek 3).²²



Rysunek 3. Przykłady aktywnych biologicznie fosfo(i)noaminokwasów.

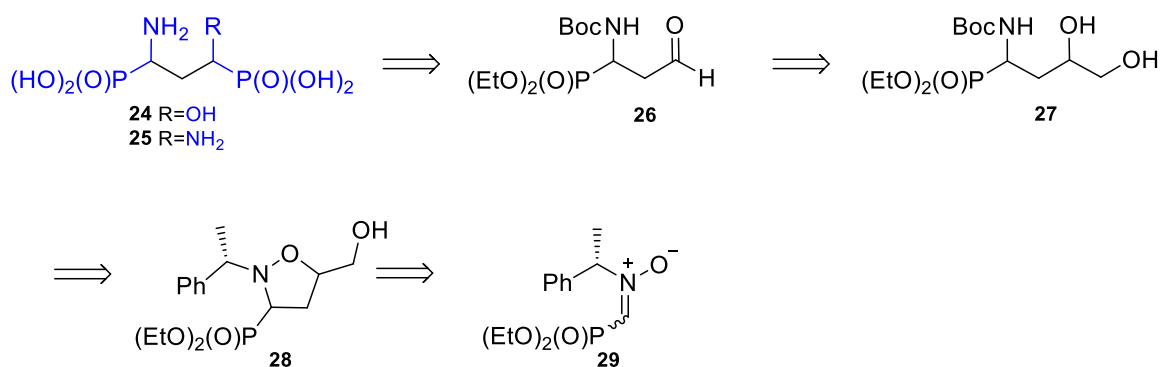
Związki **16-18** (rysunek 3) charakteryzują się z kolei antagonistycznym działaniem wobec jonotropowego receptora NMDA. Działanie przeciwdrgawkowe wykazywały pochodne AP5 **16** i AP7 **17**, przy czym w obu przypadkach izomery *R* wykazywały silniejsze działanie przeciwkonwulsyjne niż izomery o przeciwnej konfiguracji (rysunek 3).²³ Stone i współpracownicy wykazali, że izomer (*R*)-**16** ma 8-krotnie silniejsze działanie wobec receptorów NMDA w porównaniu z izomerem *S*.²⁴ Należy zauważyć, że pochodne **16** i **17**, posiadają konfigurację *R* na centrum stereogenicznym, a kwas L-glutaminowy, naturalny ligand receptorów glutaminergicznych, jest izomerem o konfiguracji *S*. Selfotel **18** wywoływał działanie przeciwbólowe i znieczulające w badaniach przeprowadzonych na małpach *Macaca mulatta* (rysunek 3).²⁵

Pochodne kwasu glutaminowego (*S*)-**19** (rysunek 4) posiadające dodatkowy podstawnik w pozycji γ mogą wykazywać różnorodną aktywność biologiczną. Kwas 4-aminoglutaminowy **20** (rysunek 4) w stężeniu $IC_{50} = 6,2 \mu\text{mol/l}$ hamował namnażanie pasożyta *Trypanosoma cruzi* wywołującego chorobę Chagasa.²⁶ Jednocześnie związek ten w stężeniach do $200 \mu\text{mol/l}$ nie wykazywał toksyczności wobec linii komórkowej CHO-K1. Z kolei kwas 4-hydroksyglutaminowy **21** o konfiguracji (*2S,4S*) wykazywał aktywność wobec metabotropowych receptorów glutaminergicznych mGlu₁R i mGlu₈R (rysunek 4)²⁷ Natomiast izomer (*2S,4R*)-**21** wykazuje preferencje względem jednego z receptorów iGluR – NMDA.²⁸ Pochodne kwasu glutaminowego **19** z ugrupowaniem fosfonowym w pozycji γ takie jak LAP4 **15**, L-tioAP4 **22** oraz L-SOP **23** (rysunek 4), wykazują aktywność agonistyczną względem glutaminergicznych receptorów metabotropowych III grupy.^{21,22,29}



Rysunek 4. Struktury kwasu glutaminowego **19** oraz jego pochodnych **20-23** o różnej aktywności biologicznej.

Aktywność biologiczna związków posiadających w swoim szkielecie kwas L-glutaminowy (*S*)-**19** zainspirowała mnie do zaprojektowania nowych sfunkcjonalizowanych pochodnych posiadających w pozycji γ hydrofilową grupę hydroksylową lub aminową (schemat 1). Ponadto, w miejsce grup karboksylowych wprowadziłam ugrupowania fosfonowe $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$. Ugrupowanie fosfonowe może konkurować z substratem posiadającym grupę karboksylową o centrum aktywne enzymu lub innego komórkowego receptora. Wprowadzenie dodatkowych grup funkcyjnych, aminowych i hydroksylowych, może prowadzić do zmiany właściwości fizykochemicznych tych związków oraz spowodować istotne zmiany w sposobie oddziaływania z receptorami. Ponieważ zaprojektowane związki posiadają dwa centra stereogeniczne, rozważyć należy syntezę wszystkich możliwych stereoizomerów, czterech dla związku **24** i trzech dla **25**. Należy bowiem założyć, że poszczególne stereoizomery różniące się konfiguracją absolutną mogą wykazywać inną aktywność biologiczną.



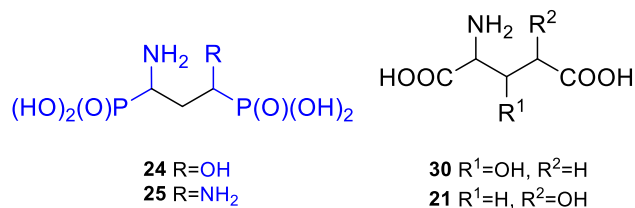
Schemat 1. Retrosynteza difosfonowych pochodnych **24** i **25**.

2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2. CZEŚĆ LITERATUROWA

Stereoselektywna synteza związków organicznych jest przedmiotem intensywnych badań w chemii medycznej. Rosnące zapotrzebowanie na związki enancjo- oraz diastereomerycznie czyste podyktowane jest obserwowanymi różnicami w aktywności związków o różnej konfiguracji absolutnej. W przypadku kiedy oba enancjomery wykazują zbliżoną aktywność farmakologiczną możliwe jest stosowanie leku w postaci mieszaniny racemicznej. Citalopram jest lekiem przeciwdepresyjnym, stosowanym w postaci racematu; enancjomer o konfiguracji *S* działa jako selektywny inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny, a enancjomer *R* wykazuje 30-krotnie słabsze działanie.³⁰ W sytuacji kiedy tylko jeden z enancjomerów wykazuje efekt terapeutyczny a drugi jest zupełnie nieaktywny, to związki także można stosować w postaci racematu, czego przykładami są niesteroidowy lek przeciwzapalny (*S*)-(+)-ketoprofen³¹ oraz beta-bloker (*S*)-(-)-propranolol³². Problem pojawia się wtedy gdy jeden z enancjomerów wykazuje określoną aktywność biologiczną, a drugi jest toksyczny, jak w przypadku lewodopy (izomer *L*), która wykazuje działanie przeciwparkinsonowe, natomiast jej izomer *D* powoduje granulocytopenię.³³ Innym wyzwaniem, z jakim mierzy się przemysł farmaceutyczny jest konieczność minimalizacji dużych ilości produktów ubocznych powstających podczas wytwarzania farmaceutyków (szacuje się, że podczas produkcji 1 kg produktu farmaceutycznego powstaje 25 – 100 kg produktów ubocznych).³⁴ Dzięki asymetrycznej syntezie można otrzymać związki o określonej, żądanej konfiguracji absolutnej. W ten sposób można obniżyć całkowitą dawkę leku przyjmowanego przez pacjenta, z zachowaniem tych samych parametrów leczenia, a z drugiej strony, wytwarzać mniejsze ilości często niebezpiecznych odpadów chemicznych.

Ponieważ w pracy doświadczalnej została zaplanowana synteza enancjomerycznie czystych fosfonowych pochodnych kwasu glutaminowego **19** z dodatkowym podstawnikiem aminowym lub hydroksylowym, w części literaturowej opisałam właściwości i metody syntezy pochodnych kwasów β -hydroksy- oraz γ -hydroksyglutaminowych (rysunek 5).

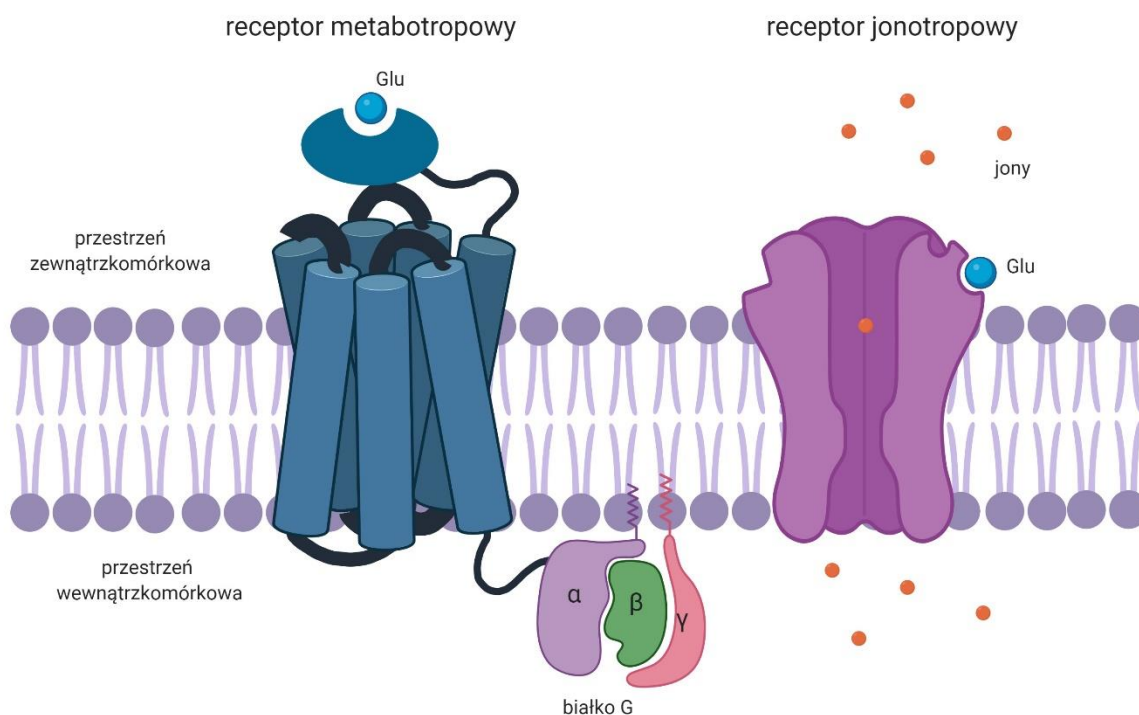


Rysunek 5. Struktury kwasu 4-amino/hydrokso(propano-1,3-diylo)difosfonowego **24, 25**, kwasu hydroksoylutaminowego **21, 30**.

2.1. Wprowadzenie – kwas glutaminowy

Kwas glutaminowy **19** (rysunek 4, str. 15) należy do 20 podstawowych aminokwasów budujących białka. Produkcja tego aminokwasu i jego soli wyniosła w 2005 roku ok. 1,7 miliona ton, co stanowiło ponad połowę światowej produkcji aminokwasów.³⁵ Duże zapotrzebowanie związane jest ze stosowaniem glutaminianu sodu jako wzmacniacza smaku w produktach spożywczych.³⁵ W organizmach kwas glutaminowy odgrywa istotną rolę w biosyntezie puryn i pirymidyn.³⁶ Bierze również udział w przemianie metabolicznej do L-glutminy przez syntetazę L-glutaminową (GS), która ma kluczowe znaczenie w funkcjonowaniu komórek.³⁷ Jednocześnie kwas glutaminowy jest głównym neuroprzekaznikiem w centralnym układzie nerwowym. Reguluje pracę większości neuronów, a zaburzenia ze strony układu glutaminergicznego wiążą się z występowaniem chorób układu nerwowego takich jak choroba Alzheimera³⁸, płasawica Huntingtona^{39,40}, choroba Parkinsona⁴¹, a także udar⁴² oraz epilepsja⁴³.

Kwas glutaminowy **19** oddziałuje na 2 rodzaje receptorów glutaminergicznych: receptory jonotropowe (iGluR)⁴⁴ oraz metabotropowe (mGluR)⁴⁵ (rysunek 6). Wśród ligandów wykazujących powinowactwo do receptorów metabotropowych istnieje wiele związków, które posiadają w swojej strukturze szkielet kwasu glutaminowego.⁴⁶ Modyfikowanie struktury kwasu glutaminowego, polegające na wprowadzaniu dodatkowych podstawników zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych w miejscu wiążącym receptora, może pomóc w odkryciu nowych selektywnych ligandów i przyczynić się do zrozumienia fizjologicznej roli każdego z tych receptorów.

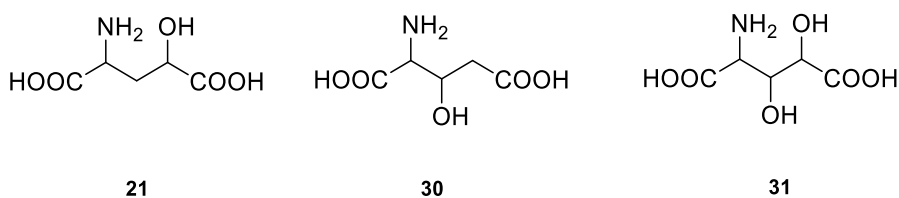


Rysunek 6. Schemat budowy receptorów glutaminergicznych: receptor metabotropowy; receptor jonotropowy. *Rycina stworzona za pomocą BioRender.com.*

2.2. Pochodne kwasu hydroksyglutaminowego w przyrodzie

Kwasy hydroksyglutaminowe są pochodnymi kwasu glutaminowego posiadającymi dodatkową grupę OH w pozycji 3 lub 4 lub w obu tych pozycjach (rysunek 7). Mimo że te kwasy nie należą do podstawowych aminokwasów budujących białka, są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, zwłaszcza wśród roślin⁴⁷, znaleziono je również w innych organizmach⁴⁸ oraz w bardziej złożonych cząsteczkach o ważnej aktywności biologicznej.⁴⁹⁻

51

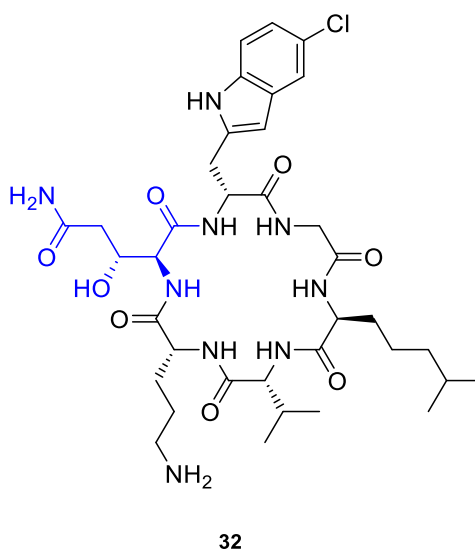


Rysunek 7. Struktury hydroksylogowych pochodnych kwasu glutaminowego **21**, **30** i **31**.

2.3. Kwas 3-hydroksyglutaminowy

2.3.1. Pochodne kwasu 3-hydroksyglutaminowego o aktywności biologicznej

Zainteresowanie kwasem 3-hydroksyglutaminowym **30** zostało zapoczątkowane odkryciem tego aminokwasu w hydrolizatach antybiotyku peptydowego S-520 (*ang. longicatenamycine A*) wyizolowanego z *Streptomyces diastaticus*.⁵⁰ Związek **32** (rysunek 8) wykazuje działanie przeciwko bakterii Gram-dodatniej (*Bacillus subtilis*).⁵¹ Badania przeprowadzone w ostatnim czasie wykazały, że ten cykloheksapeptyd zbudowany jest z kwasu 3-hydroksyglutaminowego o konfiguracji (2*S*,3*R*)-**30** (*treo*), którego synteza zostanie omówiona w kolejnym rozdziale (rysunek 11).⁵² Kwas *treo*-3-hydroksyglutaminowy został zidentyfikowany także w ścianie komórkowej *Mycobacterium lacticum*.⁴⁸

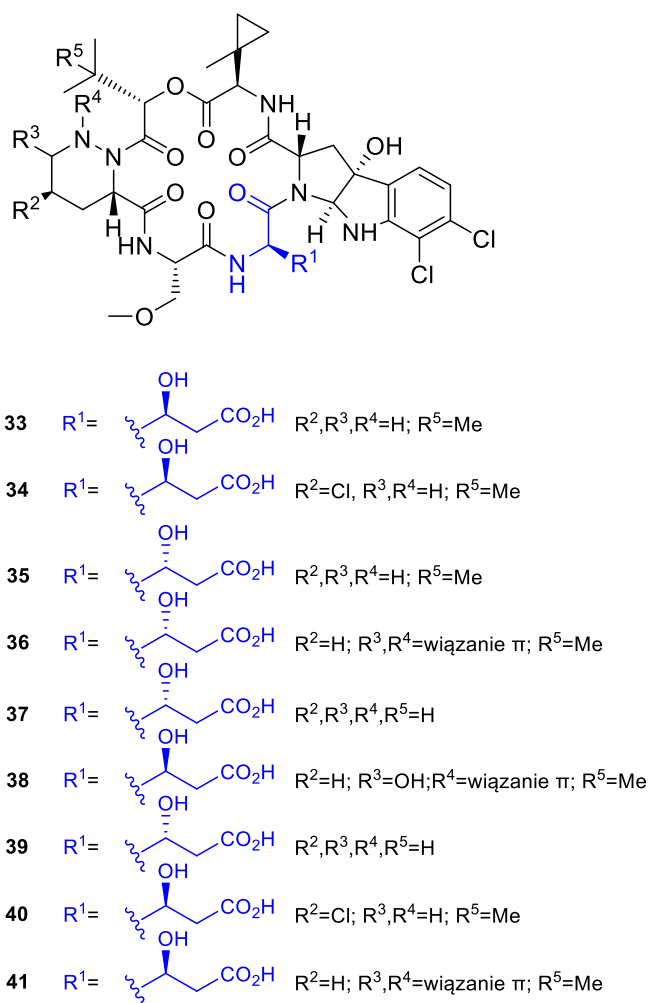


Rysunek 8. Struktura cyklicznego peptydu **32** o działaniu przeciwbakteryjnym.

Kwasy 3-hydroksyglutaminowe (2*R*,3*S*)-**30** oraz (2*R*,3*R*)-**30** występują również w cyklicznych heksadepsipeptydach (rysunek 9) (*ang. kutznerides*), które zostały wyizolowane z promieniowców *Kutzneria sp. 744*.^{53,54} Kwas o konfiguracji (2*R*,3*S*)-**30** występuje w peptydach **33**, **34**, **38**, **40** i **41** natomiast enancjomer o konfiguracji (2*R*,3*R*)-**30** w związkach **35**, **36**, **37** oraz **39**. Wykazano umiarkowaną aktywność hamującą związków **33** – **37** w stosunku do kilku grzybów *Cylindrocladium canadense*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum* oraz *Nectria radicola*.⁵³ Badania pod kątem aktywności przeciwgrzybiczej związków **33-37** przeprowadzono w zakresie stężeń od 1,0 mg/ml do 0,5 µg/ml wobec grzybów: *Cylindrocladium canadense*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium*

oxysporum oraz *Nectria radicola*.⁵³ Związki nie hamowały wzrostu grzybów *Candida albicans*, *Pseudomonas sevastanoi* pv. *sevastanoi* i *Aspergillus fumigatus* w stężeniach do 590 $\mu\text{mol/l}$.

Dla peptydów **33** – **41** wyznaczono również minimalne stężenia hamujące (MIC) wzrost patogenów grzybowych i bakteryjnych (tabela 1). Najlepszą aktywność przeciwbakteryjną wobec *Fusarium culmorum* i *Staphylococcus aureus* wykazywała pochodna **34** (w obu przypadkach MIC = 6 $\mu\text{mol/l}$) oraz przeciwgrzybiczą wobec *Fusarium culmorum* (MIC = 70 $\mu\text{mol/l}$).



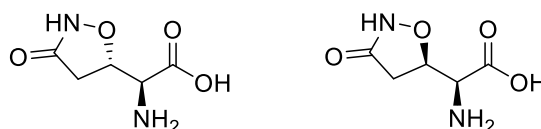
Rysunek 9. Pochodne kwasu 3-hydroksyglutaminowego **33** – **41** występujące w cyklicznych peptydach o aktywności przeciwdrobnoustrojowej.⁵⁵

Wśród przebadanych patogenów, bakterie *Staphylococcus aureus* były najbardziej podatne na działanie cyklicznych peptydów. Najlepszą aktywność wykazywały związki **33**, **34**, **35** i **40** (tabela 1).⁴⁹

Tabela 1. Minimalne stężenie hamujące (MIC) ($\mu\text{mol/l}$) cyklicznych peptydów *ang. kutznerides*.

związek	patogen			
	<i>Drechslera sorokiniana</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
33	230	60	210	12
34	110	6	70	6
35	260	12	260	9
36	>590	120	>590	140
37	>240	120	>240	120
38	>400	>230	>230	>230
39	>420	180	>420	120
40	230	6	110	6
41	>230	230	>230	60
amfoterycyna B	-	-	40	-
fungazil	4	-	17	-
streptomycyna	0,3	-		17

Kwas L-tricholomowy (\pm)-**42**, pochodna kwasu 3-hydroksyglutaminowego, została wyizolowana z *Tricholoma muscarium*, *Amanita strobiliformis* oraz *Ustilago maydis* (rysunek 10).⁵⁶⁻⁵⁸



kwas *treo*-tricholomowy (\pm)-**42a** kwas *erythro*-tricholomowy (\pm)-**42b**

Rysunek 10. Struktury kwasu *treo*- i *erythro*-tricholomowego **42a** i **42b**.

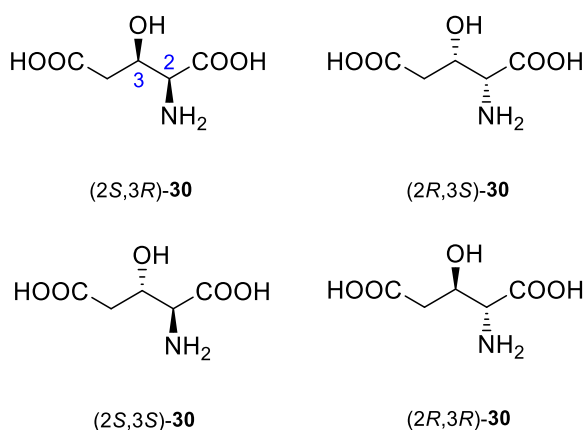
Oba stereoisomery kwasu tricholomowego, (\pm)-**42a** oraz (\pm)-**42b**, wykazywały powinowactwo do receptorów iGluR oraz mGluR, z tego powodu zostały zaklasyfikowane do nieselektywnych agonistów receptorów glutaminergicznych. Diastereoizomer *erythro* (\pm)-**42b** wykazywał 10-krotnie lepsze powinowactwo względem receptorów jonotropowych niż izomer *treo* (\pm)-**42a**; odwrotna sytuacja miała miejsce w przypadku receptorów metabotropowych (tabela 2).⁵⁹

Tabela 2. Powinowactwo do glutaminergicznych receptorów jonotropowych i metabotropowych wyrażone parametrem IC₅₀ lub EC₅₀ (μmol/l).

związki	receptory iGluR (IC ₅₀)		receptory mGluR (EC ₅₀)			
	AMPA	KA	mGluR _{1a}	mGluR ₂	mGluR ₄	mGluR ₅
42a	1,4	0,76	790	>1000	>1000	300
42b	19	6	110	100	>1000	59

2.3.2. Synteza kwasu 3-hydroksyglutaminowego

Pierwsze doniesienia opisujące rozdział oraz charakterystykę fizykochemiczną enancjomerów kwasu 3-hydroksyglutaminowego **30** pochodzą z Japonii.^{55,60} Większość asymetrycznych syntez kwasu 3-hydroksyglutaminowego zaplanowana została jako kilkietapowa sekwencja reakcji z użyciem jako materiału wyjściowego seryny lub podobnego 3-węglowego chironu. Konfiguracja na atomie węgla α pozostaje taka sama jak w wyjściowej serynie, a dodatkowo jest ona czynnikiem stereokontrolującym podczas tworzenia centrum chiralności na atomie C3 (rysunek 11).

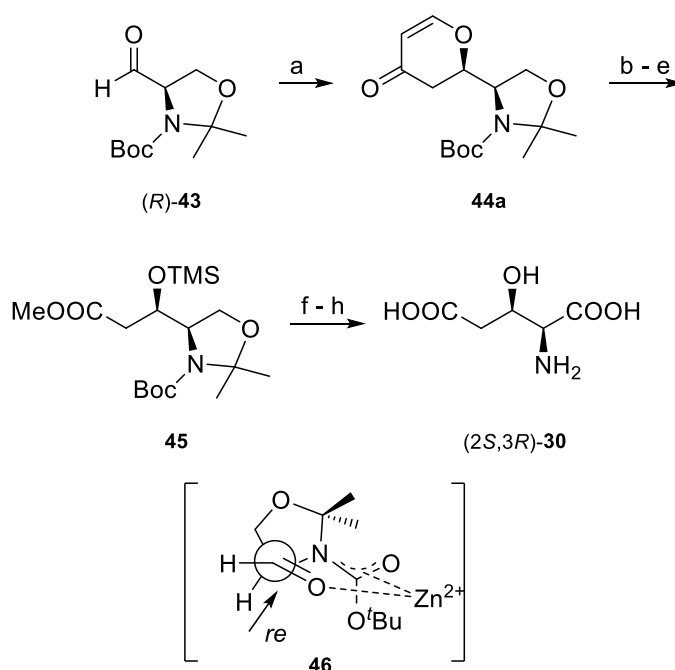


Rysunek 11. Izomery kwasu 3-hydroksyglutaminowego **30**.

2.3.2.1. Synteza kwasu 3-hydroksyglutaminowego z D-seryny

Aldehyd Garnera (*R*)-**43**, który otrzymano z D-seryny, został poddany stereoselektywnej reakcji cyklokondensacji katalizowanej chlorkiem cynku z dienem Danishefsky'ego (schemat 2). Był to kluczowy etap syntezy, ponieważ w wyniku tej reakcji powstała mieszanina diastereoizomerycznych piranonów (>9:1) **44** z przewagą izomeru *treo*. Preferowany atak na stronę *re* grupy karbonylowej możliwy jest ze względu na chelatowanie atomu tlenu grupy karbonylowej oraz atomów azotu i tlenu w amidzie przez jony cynku (schemat 2, model **46**). W kolejnym etapie produkt cyklizacji poddano utlenieniu

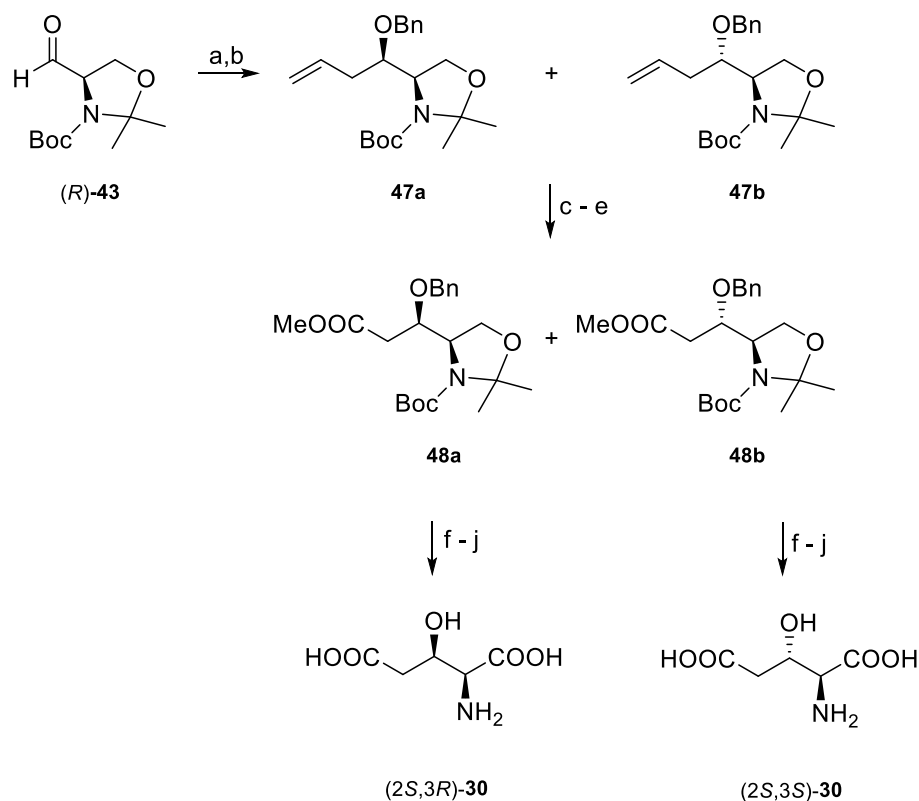
nadjodaniem sodu z rozerwaniem wiązania podwójnego. Otrzymany mrówczan poddano hydrolizie, a grupę karboksylową przekształcono w ester za pomocą diazometanu, natomiast na funkcję hydroksylową wprowadzono trimetylosililową grupę ochronną. W wyniku sekwencji reakcji otrzymano pochodną **45**, którą oddzielono od izomeru powstałego w mniejszości. Otrzymany związek **45** poddano selektywnej hydrolizie w celu usunięcia ugrupowania *N,O*-izopropylidenowego, a fragment hydroksymetylowy utleniono do funkcji karboksylowej za pomocą nadmanganianu potasu. W ostatnim etapie usunięto wszystkie grupy ochronne otrzymując związek (2*S*,3*R*)-**30** w postaci chlorowodoru (schemat 2).⁶¹



Schemat 2. Synteza kwasu (2*S*,3*R*)-**30** z aldehydu Garnera (*R*)-**43**. Odczynniki i warunki reakcji: a. MeOCH=CH-CH(OTMS)=CH₂, 5% ZnCl₂, CH₂Cl₂, 70%; b. NaIO₄, RuO₂, H₂O; c. NaOH, H₂O potem HCl, H₂O; d. CH₂N₂, eter; e. Me₃SiNEt₂, 76%; f. MeOH, PTSA, 69%; g. KMnO₄, NaOH, H₂O; h. HCl, H₂O, 61%.

W literaturze opisano alternatywną metodę syntezy kwasu 3-hydroksyglutaminowego **30**, także wykorzystującą aldehyd (*R*)-**43** jako wyjściowy materiał (schemat 3). Aldehyd (*R*)-**43** poddano addycji z odczynnikiem Grignarda, a w kolejnym etapie na funkcję hydroksylową wprowadzono benzyłową grupę ochronną otrzymując mieszaninę diastereoizomerów **47a** i **47b** w stosunku 1 : 3. Proporcje diastereoizomerów zostały ustalone za pomocą wysokosprawnej chromatografii gazowej. Mieszaninę alkenów **47a** i **47b** utleniono za pomocą *N*-tlenku 4-metylmorfoliny w obecności czterotlenku osmu, a następnie sześciowęglowy łańcuch skrócono w wyniku

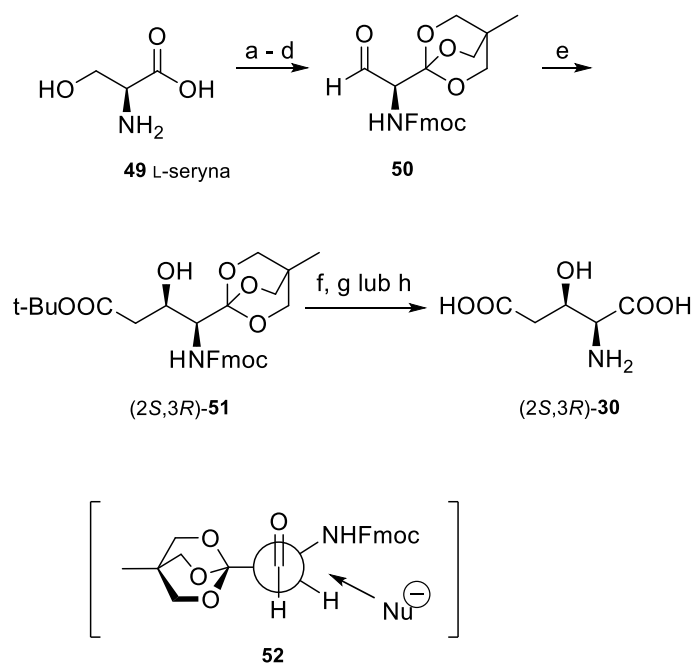
reakcji utleniania diolu za pomocą nadjodanu sodu. Otrzymany aldehyd utleniono do odpowiedniego kwasu karboksylowego, a w następnym etapie przekształcono w ester metylowy za pomocą jodku metylu w obecności węgla potasu. Na tym etapie mieszanina estrów **48a** i **48b** została chromatograficznie rozdzielona. Kwas (*2S,3R*)-**30** i (*2S,3S*)-**30** (schemat 3) otrzymano na drodze kilkietapowego przekształcenia obejmującego hydrolizę ugrupowania *N,O*-izopropylidenowego, utlenianie grupy hydroksymetylowej oraz wodorolityczne usunięcie benzylovej grupy ochronnej.⁶²



Schemat 3. Synteza kwasu (*2S,3R*)-**30** i (*2S,3S*)-**30** z aldehydu Garnera (*R*)-**43**. Odczynniki i warunki reakcji: a. $\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{MgCl}$, ZnCl_2 , THF, 88%; b. BnBr, NaH, THF, 63%; c. *N*-tlenek *N*-morfoliny, OsO_4 , dioksan/woda; d. NaIO_4 , potem NaOCl_2 , $\text{H}_2\text{NSO}_3\text{H}$; e. MeI, K_2CO_3 , aceton, 67% (etapy c-d); f. AcOH, H_2O , 64-85%; g. NaOH, MeOH, 98%; h. PDC, DMF, 90%; i. CF_3COOH , CH_2Cl_2 , 34-39%; j. H_2 , 5% Pd-C, MeOH, H_2O , 100%.

L-Serynę **49** wykorzystano jako substrat w syntezie kwasu (*2S,3R*)-3-hydroksyglutaminowego **30** (schemat 4). Grupę karboksylową L-seryny przekształcono w ortoester co pozwoliło na przeprowadzenie reakcji utleniania z uniknięciem racemizacji aldehydu **50**, który następnie został poddany reakcji Reformatskiego z 2-bromooctanem *tert*-butylu w obecności cynku. W wyniku reakcji otrzymano mieszaninę diastereoizomerów (*2S,3R*)-**51** i (*2S,3S*)-**51** (92:8). Główny diastereoizomer utworzył się w wyniku ataku na

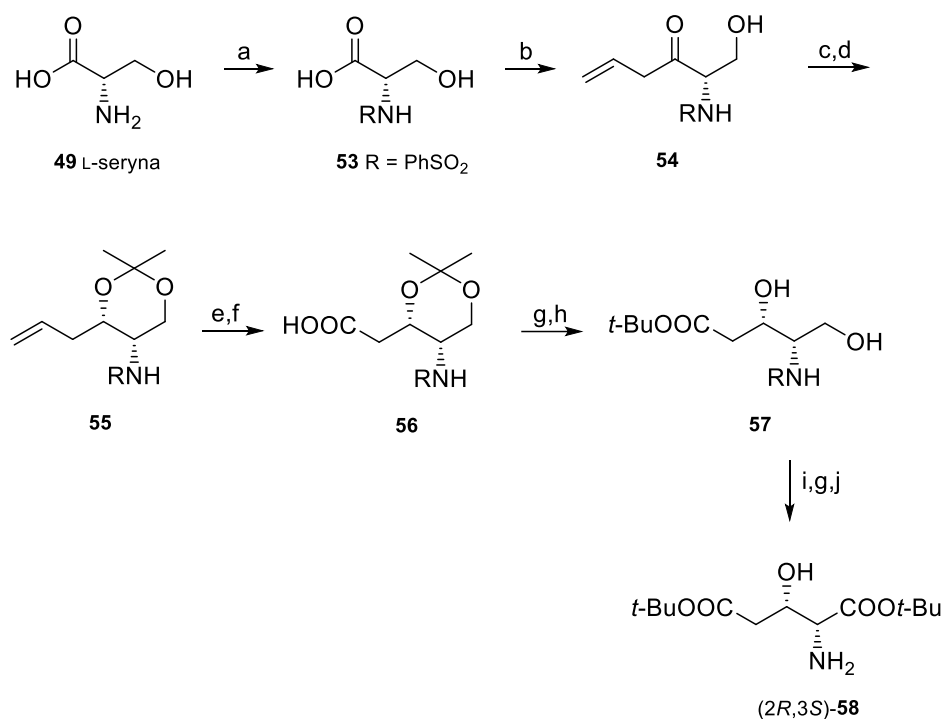
stronę *re* grupy karbonylowej, co pozostaje w zgodzie z modelem Felkina-Ahna przedstawionego wzorem **52**, w którym atak nukleofila jest uprzywilejowany od strony mniej zawadzonej przestrzennie (schemat 4). Po usunięciu wszystkich grup ochronnych jodotrimetylosilanem, kwas 3-hydroksylutaminowy **30** został otrzymany w postaci monoamoniowej soli [(2*S*,3*R*) : (2*S*,3*S*), 94 : 6] oraz w postaci chlorowodoru [(2*S*,3*R*) : (2*S*,3*S*), >98:2] (schemat 4).⁶³



Schemat 4 Synteza kwasu (2*S*,3*R*)-3-hydroksy-L-glutaminowego **30** z L-seryny **49**.
 Odczynniki i warunki reakcji: a. Fmoc-sukcynoimid, Na₂CO₃, dioksan, H₂O; b. (3-hydroksymetylo)-3-metyloksetan, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 67%; c. BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, 76%; d. chlorek oksalilu, DMSO, DIPEA, CH₂Cl₂, 100%; e. BrCH₂COO*t*-Bu, Zn, THF, t. w., 73%; f. TMSI; g. kolumna kationowymienna, NH₄OH; h. kolumna kationowymienna, HCl.

W reakcji bromku allilomagnezowego z solą trójlitową *N*-ochronionego kwasu **53** otrzymanego z L-seryny **49** zsyntezowano keton **54**, który poddano stereoselektywnej redukcji za pomocą L-selektrydu otrzymując mieszaninę diastereoizomerycznych dioli *syn* : *anti* w stosunku 9:1 (schemat 5). Diole po wprowadzeniu izopropylidenowej grupy ochronnej zostały rozdzielone, a izomer *syn* poddano ozonolizii i utlenianiu uzyskując kwas **56**. Związek **56** został następnie przekształcony w ester **57** za pomocą kwasu solnego w metanolu, a w kolejnym etapie pierwszorzędowa grupa hydroksylowa została selektywnie utleniona do kwasu karboksylowego, poddanego następnie estryfikacji i redukcji

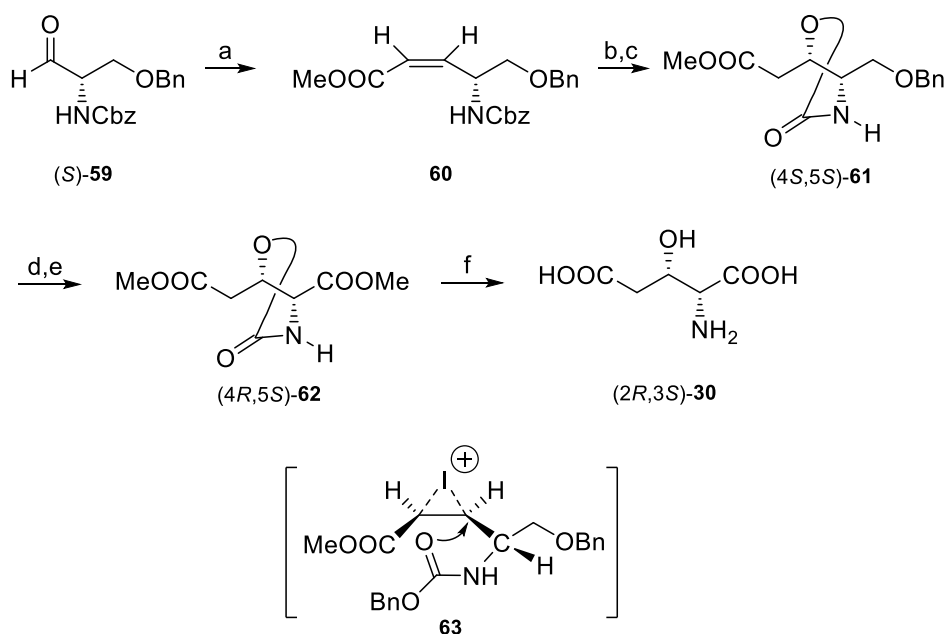
elektrochemicznej uzyskując finalny produkt (2*R*,3*S*)-**58** (schemat 5). Wydajność całkowita syntezy począwszy od L-seryny wyniosła 30%.⁶⁴



Schemat 5 Synteza estru (2*R*,3*S*)-**58** z L-seryny. Odczynniki i warunki reakcji: a. PhSO₂Cl, K₂CO₃, H₂O, 85%; b. BuLi, THF; potem H₂C=CHCH₂MgBr, -78°C, 78%; c. L-selektryd, THF, -78°C, 95%; d. Me₂C(OMe)₂, PTSA, THF, 87%; e. O₃, CH₂Cl₂, eter, potem Ph₃P; f. KMnO₄, aceton, H₂O, 80-85%; g. *t*-BuOH, *N,N'*-diizopropyl-*O*-*tert*-butyloizomocznik, CH₂Cl₂, t. w.; h. MeOH, HCl (gaz); i. O₂, Pt, AcOEt, H₂O; j. elektrochemiczna redukcja.

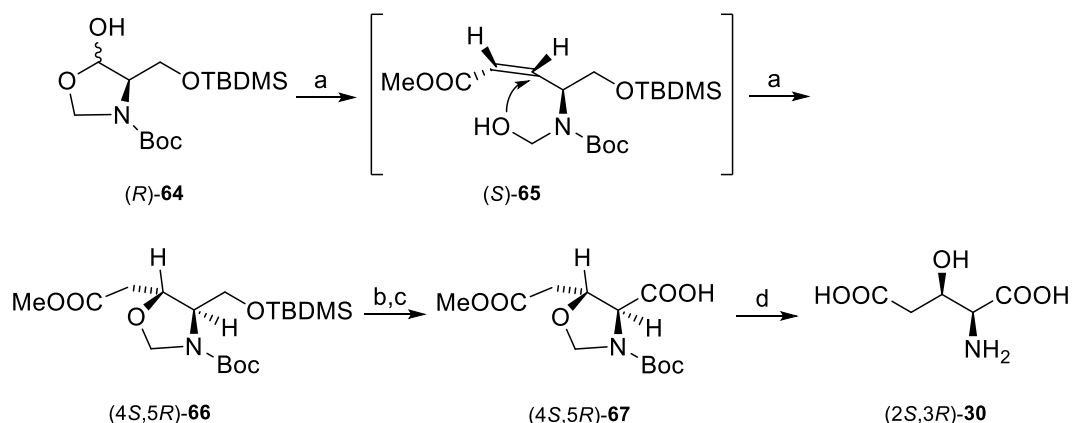
Aldehyd (*S*)-**59** otrzymano z handlowo dostępnej *O*-benzylo-L-seryny w standardowej trzyetapowej sekwencji reakcji obejmującej wprowadzenie benzyloksykarbonylowej grupy ochronnej na atom azotu oraz redukcję grupy karboksylowej do hydroksymetylowej, a następnie utlenianie do funkcji aldehydowej (schemat 6).⁶⁵ W reakcji Wittiga uzyskano *Z*-alken **60**, wydłużając w ten sposób cząsteczkę o dwa atomy węgla. Kluczowym etapem reakcji było stereoselektywne wprowadzenie nowego centrum stereogenicznego o wymaganej konfiguracji poprzez addycję jodu do wiązania podwójnego. Produktem pośrednim reakcji był jon jodoniowy **63**, który uległ reakcji z grupą karbonylową funkcji benzyloksykarbonylowej prowadząc do otrzymania *trans*-oksazolidyn-2-onu (4*S*,5*S*)-**61**. Wodorolityczne usunięcie grup benzylowych, a następnie utlenianie funkcji hydroksymetylowej za pomocą odczynnika Jonesa pozwoliło na uzyskanie diestru (4*R*,5*S*)-**62**, który poddano hydrolizie w warunkach kwasowych otrzymując związek (2*R*,3*S*)-**30**

w postaci chlorowodoru (schemat 6).⁶⁵ W analogiczny sposób można otrzymać kwas o konfiguracji (2*S*,3*R*)-**30** stosując *O*-benzylo-D-serynę jako wyjściowy materiał.



Schemat 6. Synteza kwasu (2*R*,3*S*)-**30** z *O*-benzylo-L-seryny. Odczynniki i warunki reakcji: a. (CF₃CH₂O)₂P(O)CH₂COOMe, KHMDS, 18-korona-6, 63%; b. I₂, MeCN; c. Bu₃SnH, AIBN, benzen, t. w., 61%; d. H₂, 10% Pd/C, etanol, 95%; e. CrO₃, aceton, potem, CH₂N₂, eter, 70%; f. 3*N* HCl, 80°C, 75%.

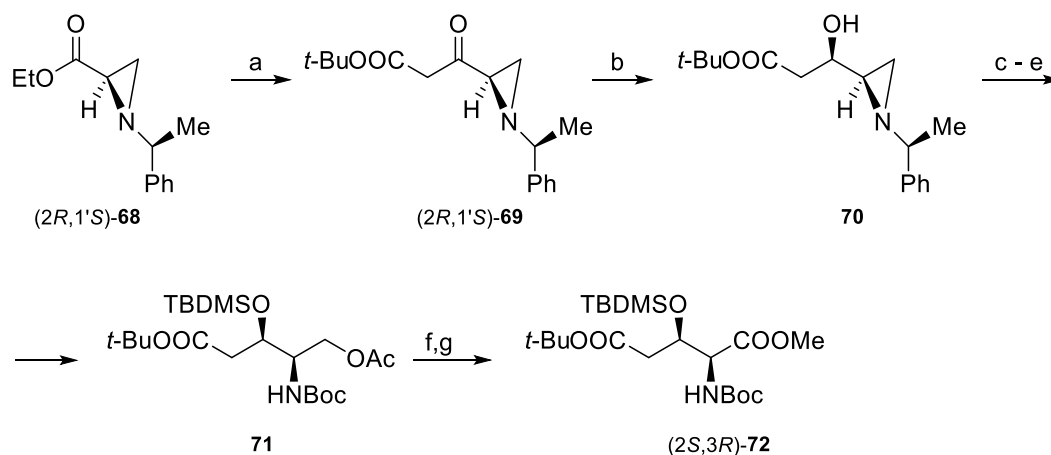
Trwałą konfiguracyjnie pochodną D-seryny (*R*)-**64**,⁶⁶ która występuje głównie w formie hemiacetalowej, poddano reakcji *cis*-olefinowania odczynnikami Stilla w temperaturze -30°C otrzymując produkt (*S*)-**65** (schemat 7). W zasadowych warunkach po ogrzaniu do temperatury 0°C zaszła wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja (schemat 7, struktura (*S*)-**65**). Oksazolidyna (4*S*,5*R*)-**66** powstała z wysoką diastereoselektywnością (d.r. >20:1) dzięki zawadzie sterycznej wymuszającej preferowany nukleofilowy atak atomu tlenu grupy hydroksylowej na stronę *re* wiązania podwójnego. Selekttywne usunięcie silylowej grupy ochronnej za pomocą kwasu *p*-toluenosulfonowego pozwoliło na przekształcenie grupy hydroksymetylowej do kwasu karboksylowego (4*S*,5*R*)-**67**. Związek **67**, zawierający funkcję estrową poddano kwasowej hydrolizie uzyskując kwas dikarboksylowy (2*S*,3*R*)-**30** w postaci chlorowodoru (schemat 7).⁶⁶



Schemat 7. Synteza kwasu $(2S,3R)\text{-}30$ wykorzystująca reakcję typu one-pot: *cis*-olefinowanie i sprzężona addycja. Odczynniki i warunki: a. $(\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{COOMe}$, KHMDS, 18-korona-6, THF, 90%; b. PTSA, MeOH, 82%; c. NaOCl, TEMPO, KBr, NaHCO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, 97%; d. 3M HCl, 80°C , 98%.

2.3.2.2. Synteza kwasu 3-hydroksyglutaminowego z homochiralnej azyrydyny

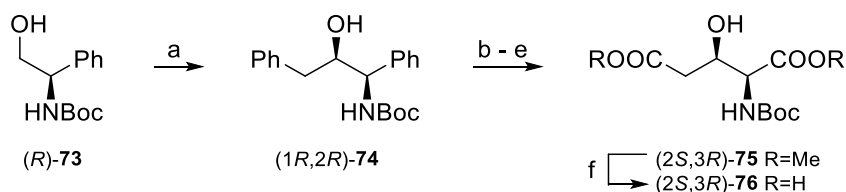
Interesującym podejściem w syntezie ochronionej pochodnej $(2S,3R)\text{-}30$ było zastosowanie azyrydyny $(2R,1'S)\text{-}68$ jako wyjściowego materiału (schemat 8).⁶⁷ Stereoselektywna redukcja ketonu $(2R,1'S)\text{-}69$ za pomocą borowodoru sodu w izopropanolu w temperaturze -40°C doprowadziła do otrzymania hydroksyazyrydyny **70** jako głównego produktu reakcji (d.e. 82 %). W kolejnym etapie, po wprowadzeniu *tert*-butylodimetylosililowej grupy ochronnej na funkcję hydroksylową, przeprowadzono regioselektywne otwarcie pierścienia azyrydyny za pomocą kwasu octowego oraz wodorolityczne usunięcie pomocnika chiralnego z jednoczesnym utworzeniem ochronionej aminy **71**. Kolejnym etapem była hydroliza octanu w warunkach zasadowych i utlenianie grupy hydroksymetylowej do karboksylowej, którą następnie poddano estryfikacji za pomocą jodku metylu otrzymując diester $(2S,3R)\text{-}72$. Związek **72** o konfiguracji $(2R,3S)$ został otrzymany w oparciu o taką samą metodologię z azyrydyny $(2S,1'R)\text{-}68$.⁶⁷



Schemat 8. Synteza ortogonalnie ochronionej pochodnej $(2S,3R)\text{-72}$ z chiralnej azyrydyny. Odczynniki i warunki: a. LiHMDS, AcO*t*-Bu, THF, -40°C , 88%; b. NaBH₄, *i*-PrOH, -40°C 88%; c. *t*-BuMe₂SiCl, TEA, DMAP, CH₂Cl₂, 91%; d. AcOH, CH₂Cl₂, 91%; e. H₂, 10% Pd(OH)₂, Boc₂O, MeOH, 99%; f. KOH, EtOH, 0°C , 99%; g. NaIO₄, RuCl₃, CCl₄/MeCN/H₂O; potem MeI, KHCO₃, DMF, 79%.

2.3.2.3. Synteza kwasu 3-hydroksyglutaminowego z *N*-Boc-D-fenyloglicynolu

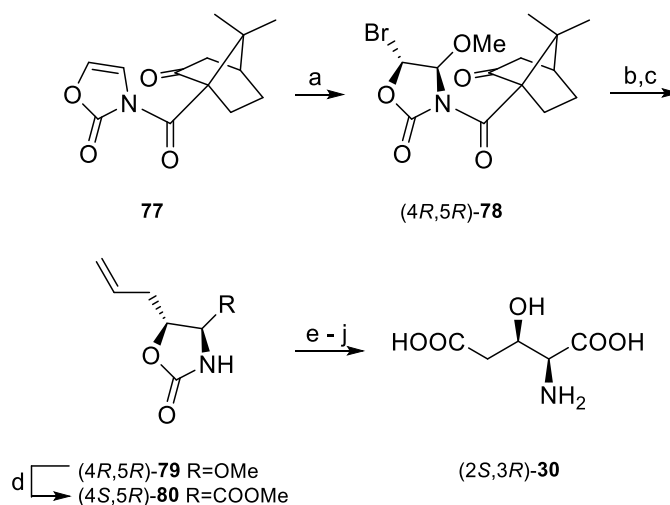
Innym użytecznym prekursorem w syntezie *N*-Boc-pochodnej kwasu $(2S,3R)\text{-76}$ był fenyloglicynol $(R)\text{-73}$, który poddano utlenianiu w warunkach Swerna (schemat 9).⁶⁸ *N*-Boc-D-fenyloglicynol został poddany reakcji *in situ* z chlorkiem benzylomagnezowym otrzymując jako główny produkt związek $(1R,2R)\text{-74}$ (d.r. 9:1). Alkohol $(1R,2R)\text{-74}$ wydzielono chromatograficznie. Przed utlenianiem obu grup fenylowych za pomocą nadjodanu sodu, w pierwszej kolejności należało wprowadzić izopropylidenową grupę ochronną stosując 2,2-dimetoksypropan w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego. Powstały kwas poddano estryfikacji za pomocą diazometanu, a ugrupowanie izopropylidenowe zhydrolizowano stosując 80% kwas octowy. Pochodną $(2S,3R)\text{-76}$ otrzymano z estru **75** w wyniku zasadowej hydrolizy.



Schemat 9. Synteza pochodnej $(2S,3R)\text{-76}$ z D-fenyloglicynolu **73**. Odczynniki i warunki reakcji: a. DMSO, chlorek oksalilu, CH₂Cl₂, potem BnMgCl, eter, 63%; b. Me₂C(OMe)₂, PPTS, toluen, 82%; c. NaIO₄, RuCl₃, NaHCO₃, CCl₄/MeCN/H₂O, 69%; d. CH₂N₂, eter, 85%; e. 80% AcOH, 80%; f. LiOH, H₂O/THF/MeOH, 78%.

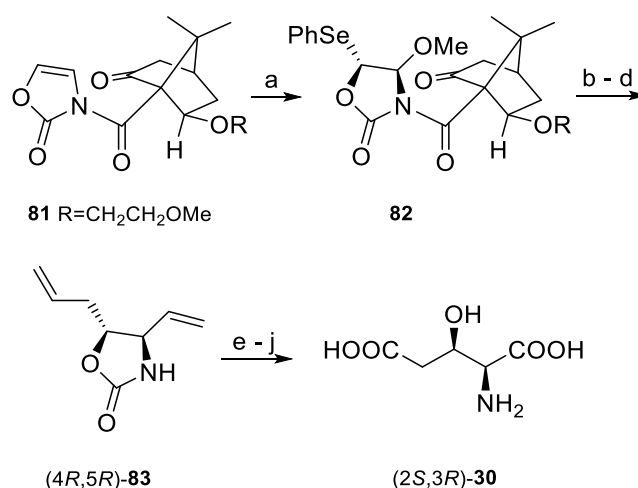
2.3.2.4. Synteza kwasu 3-hydroksyglutaminowego poprzez funkcjonalizowanie 2(3*H*)-oksazolonu za pomocą kwasu ketopinowego

Oksazolon **77**, otrzymany z kwasu (*R*)-(-)-ketopinowego, poddano reakcji z bromem i ortoocetanem trimetylu otrzymując, po przekrystalizowaniu mieszaniny reakcyjnej, czystą pochodną (*4R,5R*)-**78** (schemat 10). Wydłużenie łańcucha węglowego i zainstalowanie dodatkowej grupy karboksylowej poprzedzono wprowadzeniem funkcji allilowej za pomocą allilotributylocyny, przy czym reakcja odbywa się z zachowaniem konfiguracji na atomie C5 w pierścieniu oksazolonomym. W następnym etapie, po usunięciu pomocnika chiralnego za pomocą dibutyłomiedzianu litu, otrzymano związek (*4R,5R*)-**79**, który poddano reakcji z cyjankiem trimetylosililu w obecności tetrachlorku cyny. Następnie grupa nitrylowa została zhydrolizowana w warunkach kwasowych, a pierścień oksazolidynonu otwarto za pomocą katalitycznych ilości węglanu cezu. Po wprowadzeniu osłony *tert*-butylodimetylosililowej na grupę hydroksylową i utlenieniu wiązania podwójnego do grupy karboksylowej za pomocą nadjodanu sodu, a następnie kwasowej hydrolizie otrzymano kwas (*2S,3R*)-**30** (schemat 10).⁶⁹



Schemat 10. Synteza kwasu (*2S,3R*)-**30** z wykorzystaniem kwasu (*R*)-ketopinowego jako pomocnika chiralnego. Odczynniki i warunki reakcji: a. Br₂, MeC(OMe)₃, Me₃SiOTf, CH₂Cl₂, -100°C, 78%; b. H₂C=CHCH₂SnBu₃, hv, 85%; c. Bu₂CuLi, 83%; d. Me₃SiCN, TiCl₄, CH₂Cl₂, potem MeOH, HCl, 86%; e. Boc₂O, NaH, THF, 87%; f. Cs₂CO₃, MeOH, 86%; g. *t*-BuMe₂SiCl, imidazol, DMF, 82%; h. NaIO₄, KMnO₄, potem CH₂N₂, eter, 85%; i. TBAF, 0°C, 79%; j. 100°C, 6M HCl, 92%.

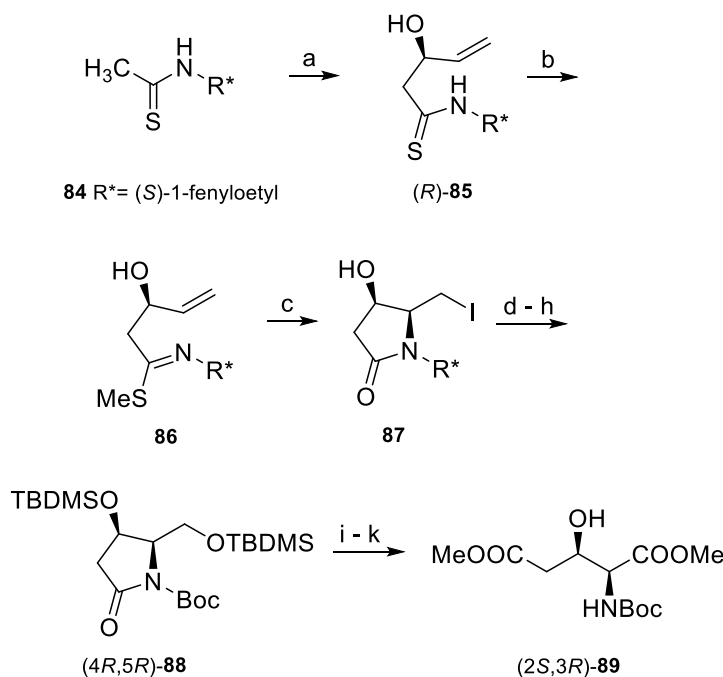
Inne zastosowanie szkieletu kwasu ketopinowego jako chiralnego pomocnika polegało na zapewnieniu odpowiedniej osłony sterycznej wokół grupy karbonylowej (schemat 11). Związek **81**, otrzymany z łatwo dostępnego kwasu (*S*)-(+)-ketopinowego, poddano reakcji z chlorkiem fenylselenowym w metanolu uzyskując addukt **82** z wysoką diastereoselektywnością (d.e. 96%) po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej. Generowana *in situ* sól litowa merkaptanu benzylu została wykorzystana do usunięcia pomocnika chiralnego. W kolejnym etapie wprowadzono podstawnik allilowy poprzez reakcję odczynnika miedziowego generowanego *in situ* z cyjanku miedzi i bromku allilomagnezowego w obecności eteratu trifluorku boru, otrzymując pochodną **83** z wydajnością 69%. Po otwarciu pierścienia oksazolidynonu w zasadowych warunkach, wprowadzono funkcję izopropylidenową na atomy tlenu i azotu, a następnie utleniono grupy allilową i winylową w standardowych warunkach do grup karboksylowych, które następnie przekształcono w diester za pomocą diazometanu. Kwas **30** otrzymano w postaci chlorowodoru w reakcji kwasowej hydrolizy (schemat 11).⁷⁰



Schemat 11. Synteza kwasu (2*S*,3*R*)-**30** z zastosowaniem kwasu (1*S*)-2-*exo*-metoksyetoksyapokamfano-1-karboksylowego jako chiralnego pomocnika. Odczynniki i warunki reakcji: a. PhSeCl, MeOH, -20°C, 82%; b. H₂C=CHCH₂SnBu₃, eter, hv, 71%; c. BnSLi, THF, 80%; d. (H₂C=CH)₂CuCNMgBr, BF₃·OEt₂, THF, -30°C, 69%; e. Boc₂O, DMAP, THF, 96%; f. Cs₂CO₃, MeOH, 96%; g. Me₂C(OMe)₂, PTSA, benzen, 80°C, 86%; h. NaIO₄, KMnO₄, H₂O/CH₃C(O)CH₃, potem CH₂N₂, 50%, eter; j. MeOH, HCl (gaz), 0°C, 71%.

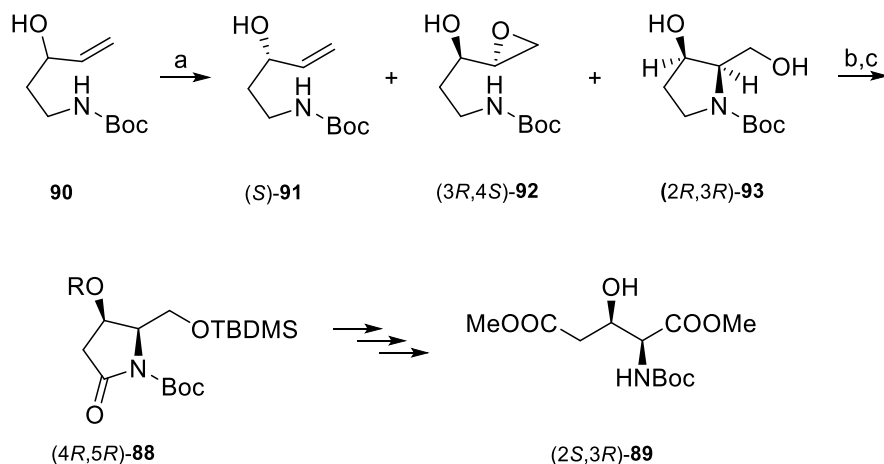
2.3.2.5. Synteza kwasu 3-hydroksyglutaminowego poprzez utworzenie pierścienia pirolidyny

Ważna strategia w syntezie kwasów 3-hydroksyglutaminowych polegała na tworzeniu pochodnej pirolidyny jako produktu pośredniego (schemat 12). Addycja dianionu związku **84** do akroleiny prowadziła do utworzenia mieszaniny diastereoizomerycznych adduktów (*R*)-**85** i (*S*)-**85** w stosunku 69 : 31. Produkt (*R*)-**85** oczyszczono na żelu krzemionkowym (49%). Konfiguracja absolutna głównego diastereoizomeru (*R*)-**85** została ustalona na podstawie porównania jego skręcalności właściwej z wartością literaturową [$\alpha^{22.5} = -56,6^\circ$ ($c = 0,685$; CHCl_3) lit. $\alpha^{22.5} = -56,5^\circ$ ($c = 0,5$; CHCl_3)]. W wyniku metylowania pochodnej (*R*)-**85** powstała imina **86**, którą poddano stereoselektywnej jodolaktonizacji z utworzeniem laktamu **87** o takiej samej konfiguracji jak w związku (*2S,3R*)-**30** (schemat 11, strona 32). W następnym etapie grupa jodometylowa została przekształcona w ugrupowanie hydroksymetylowe, a obie funkcje hydroksylowe zostały ochronione ugrupowaniem silylowym. Chiralną grupę (*S*)-*N*-1-fenyletylową na atomie azotu zastąpiono funkcją *tert*-butoksykarbonylową uzyskując pochodną (*4R,5R*)-**88**. W zasadowych warunkach nastąpiło otwarcie pierścienia pirolidyn-2-onu prowadzące do otrzymania pięciowęglowego łańcucha. Po uwolnieniu grup hydroksylowych za pomocą fluorku tetrabutylamonowego, grupę hydroksymetylową utleniono do karboksylowej, a następnie poddano estryfikacji za pomocą diazometanu z utworzeniem diestru metylowego (*2S,3R*)-**89** (schemat 12).⁷¹



Schemat 12. Synteza *N*-blokowanego estru dimetylowego (*2S,3R*)-**89** z (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)tioacetamidu. Odczynniki i warunki reakcji: a. BuLi, THF, potem H₂C=CHCHO, 49%; b. MeI, K₂CO₃, aceton; c. I₂, THF, 5°C 73% (etapy b i c); d. EtCOO⁻ Cs⁺, DMF, 60°C, 65%; e. K₂CO₃, EtOH, 89%; f. *t*-BuMe₂SiCl, imidazol, DMAP, DMF, 100%; g. Na, NH₃aq, 45%; h. Boc₂O, NaH, THF, 80%; i. KOH, MeOH/H₂O, 85°C, potem CH₂N₂, eter, 75%; j. TBAF, THF; k. O₂, Pt, potem CH₂N₂, 42%.

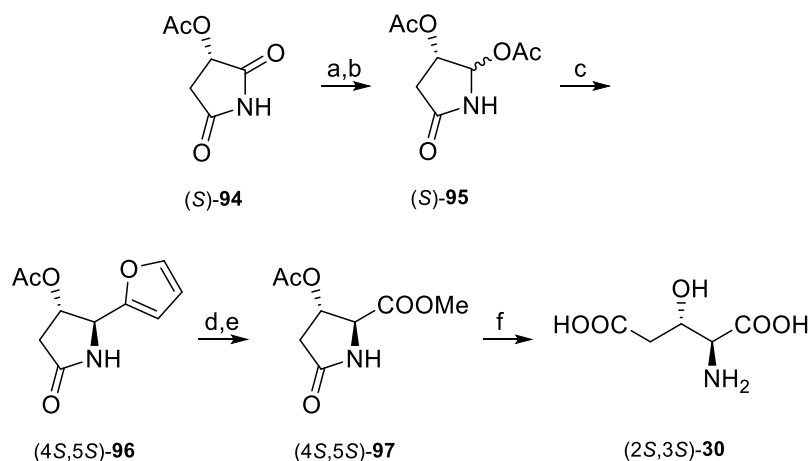
Reakcja epoksydowania Sharplessa alkoholu allilowego **90** prowadziła do otrzymania mieszaniny związków (*S*)-**91**, (*3R,4S*)-**92** i (*2R,3R*)-**93** w stosunku wynoszącym odpowiednio 46 : 11 : 33 (schemat 13). Związek (*S*)-**91** był produktem kinetycznego rozdziału, natomiast alkohol (*2R,3R*)-**93** powstawał w wyniku wewnątrzcząsteczkowego otwarcia pierścienia oksiranowego w związku (*3R,4S*)-**92**. Po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej, grupy hydroksylowe w związku (*2R,3R*)-**93** zostały ochronione ugrupowaniem *tert*-butyldimetylosililowym, co umożliwiło utlenianie atomu C5 z utworzeniem pirolidyn-2-onu (*4R,5R*)-**88** (schemat 13), który następnie przekształcono w pochodną (*2S,3R*)-**89** w sekwencji przedstawionych wcześniej reakcji (schemat 12).⁷²



Schemat 13. Synteza *N*-chronionego estru dimetylowego związku *(2S,3R)*-**89** poprzez epoksydowanie Sharplessa. Odczynniki i warunki reakcji: a. TBHP, D(-)-DIPT, Ti(*O*-Pr)₄, MS, CH₂Cl₂, -20°C; b. *t*-BuMe₂SiCl, imidazol, DMAP, DMF, 59%; c. NaIO₄, RuO₂, AcOEt/H₂O, 63%; d. MeONa, 71%.

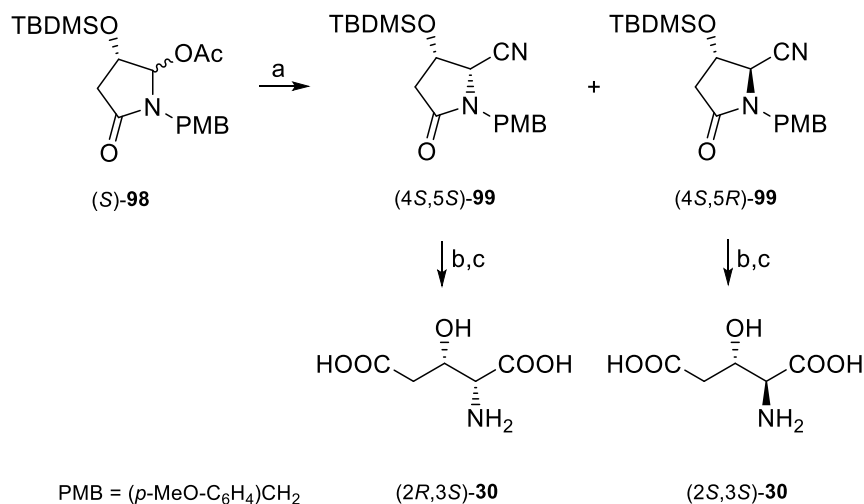
2.3.2.6. Synteza kwasu 3-hydroksyglutaminowego z kwasu L-jabłkowego

(S)-Acetoksyprolidyno-2,5-dion **94**, otrzymany z kwasu L-jabłkowego, został poddany redukcji borowodorkiem sodu, a następnie acetylowaniu prowadzącemu do otrzymania związku *(S)*-**95** (schemat 14). W kolejnym etapie w reakcji z furanem w obecności bromku cynku i chlorku trimetylosililu powstała mieszanina związków *(4S,5S)*-**96** i *(4R,5S)*-**96** w stosunku 67 : 33, a główny diastereoizomer *(4S,5S)*-**96** wydzielono z 48% wydajnością. Powstawanie większej ilości izomeru *trans* jest wynikiem sterycznej zawady grupy acetoksylowej. Pierścień furanowy został utleniony za pomocą ozonu do grupy karboksylowej, którą poddano estryfikacji diazometanem, otrzymując *(4S,5S)*-3-acetoksyproglutaminian metylu *(4S,5S)*-**97** – cykliczną pochodną kwasu 3-hydroksyglutaminowego **30**. Kwas *(2S,3S)*-**30** został otrzymany w postaci chlorowodoru po reakcji ze stężonym kwasem solnym (schemat 14).⁷³



Schemat 14. Synteza kwasu (2*S*,3*S*)-**30** z imidu kwasu L-jabłkowego **94**. Odczynniki i warunki reakcji: a. NaBH₄, MeOH/CH₂Cl₂, -15°C; b. Ac₂O, PCC; c. furan, ZnBr₂, Me₃SiCl, MeNO₂, -15°C, 71% (etapy a-c); d. O₃, MeOH, -78°C, potem CH₂N₂, eter, 87%; f. 6M HCl, 92%.

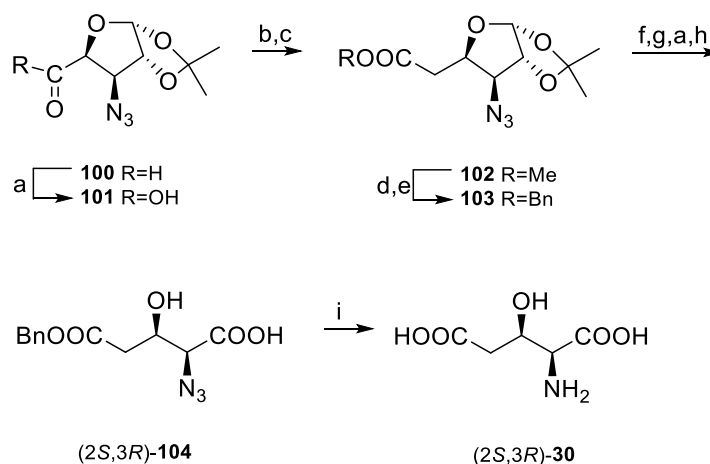
W innej strategii, w której substratem był również kwas L-jabłkowy, zaproponowano lepszą „ekonomię atomową”, ponieważ w tej metodzie w reakcji laktamu (*S*)-**98** z cyjankiem wprowadzano jeden atom węgla do cząsteczki, podczas gdy we wcześniej opisanej metodzie przyłączono 3 atomy węgla, które później usunięto (schemat 15). Cyjanki (4*S*,5*S*)-**99** i (4*S*,5*R*)-**99**, powstałe w stosunku 57 : 43, wydzielono na kolumnie chromatograficznej z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 56% i 42%, a ich przekształcenie odpowiednio w kwasy (2*R*,3*S*)-**30** (40%) i (2*S*,3*S*)-**30** (43%) wymagało usunięcia grup *p*-metoksybenzylowych i przeprowadzenia kwasowej hydrolizy (schemat 15).⁷⁴



Schemat 15. Synteza kwasów $(2R,3S)\text{-30}$ i $(2S,3S)\text{-30}$ z laktamu **98**. Odczynniki i warunki reakcji: a. Me_3SiCN , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , 0°C , $(4S,5S)\text{-99}$ 56%, $(4S,5R)\text{-99}$ 42%; b. $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$, MeCN , 0°C ; c. 6M HCl , t. w., potem Dowex 50W-X8, $(4S,5S)\text{-30}$ 40%, $(4S,5R)\text{-30}$, 43% (etapy b i c).

2.3.2.7. Synteza kwasu 3-hydroksyglutaminowego z D-glukozy

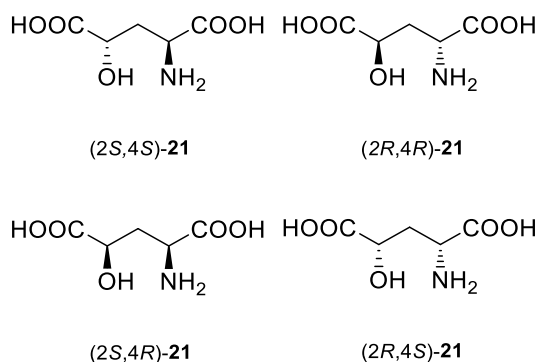
D-Glukoza może być wykorzystana jako chiron w syntezie kwasu $(2S,3R)\text{-30}$, ponieważ konfiguracje na atomach C3 i C4 w heksozie pozostają takie same jak w finalnym produkcie (schemat 16). Azydek **100** otrzymano w wyniku kilku etapowej syntezy z D-glukozy z wydajnością wynoszącą 50-57%.⁷⁵ Wydłużenie łańcucha kwasu **101** przeprowadzono poprzez reakcję Arndta-Eiserta otrzymując ester metylowy **102**, który następnie przekształcono w ester benzylowy **103** w celu łatwego wodorolitycznego usunięcia benzylu w ostatnim etapie. Po hydrolizie ugrupowania izopropylidenu za pomocą kwasu trifluorooctowego przeprowadzono utlenianie wicynalnego diolu nadjodanem sodu z jednoczesnym rozerwaniem wiązania C1–C2 w furanie. Uzyskany aldehyd utleniono do kwasu i przekształcono w ester $(2S,3R)\text{-104}$, który poddano wodorolizacji uzyskując finalny produkt $(2S,3R)\text{-30}$ w postaci chlorowodoru (schemat 16).⁷⁶



Schemat 16. Synteza kwasu (2S,3R)-**30** z D-glukozy. Odczynniki i warunki reakcji: a. NaClO₂, 30% H₂O₂, NaH₂PO₄, MeCN, 0→20°C, 91%; b. ClCOOEt, NEt₃, 0°C, potem CH₂N₂, eter, 0→20°C, 80%; c. MeOH, PhCOOAg, NEt₃, 55%; d. LiOH, THF/H₂O, 0°C, 86%; e. ClCOOBn, NEt₃, DMAP; f. TFA, H₂O, 0°C, 63%; g. NaIO₄, CH₃C(O)CH₃/H₂O, 79%; a. NaClO₂, 30% H₂O₂, NaH₂PO₄, MeCN, 0→20°C; h. NaHCO₃, THF/H₂O, 0°C 71% (etapy f,g,a,h); i. H₂, 10% Pd/C, MeOH/HCl, 95%.

2.4. Kwas 4-hydroksyglutaminowy

Kwas 4-hydroksyglutaminowy **21**, podobnie jak jego izomer **30**, występuje w roślinach (rysunek 12). Po raz pierwszy wyizolowano go w 1955 roku z rośliny *Phlox decussata*.⁷⁷ W kolejnych latach opisano jego syntezę wraz z rozdzieleniem wszystkich stereoizomerów oraz ustaleniem konfiguracji absolutnej.^{78,79} Obecność kwasu 4-hydroksy-L-glutaminowego [(2S,4S)-**21**] stwierdzono także w innych gatunkach *Phlox*⁴⁷, *Hemerocallis fulva* oraz *Linaria vulgaris*.⁸⁰



Rysunek 12. Enancjomery kwasu 4-hydroksyglutaminowego **21**.

Wykazano, że izomer *treo* kwasu 4-hydroksyglutaminowego [(2S,4S)-**21**] jest produktem pośrednim metabolizmu hydroksyproliny u ssaków.^{81,82} Różne amidy tego

związku zidentyfikowano w wielu roślinach,⁸³⁻⁸⁸ ponadto wykazano jego występowanie w szkieletach bardziej złożonych cząsteczek, takich jak cyklopeptydy czy lipopetydy, wytwarzanych przez różne gatunki.⁸⁹⁻⁹¹

Kwas 4-hydroksyglutaminowy **21** został wykorzystany w diagnozowaniu i przewidywaniu stanu przedrzucawkowego u ciężarnych kobiet. W stanie przedrzucawkowym poziom kwasu 4-hydroksyglutaminowego **21** w próbkach krwi był zdecydowanie wyższy niż w przypadku próbek pochodzących od pacjentek, u których nie występowała preeklampsja.⁹²

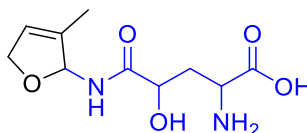
2.4.1. Kwas 4-hydroksyglutaminowy oraz jego pochodne o aktywności biologicznej

Diastereoizomery kwasu 4-hydroksyglutaminowego (*2S,4S*)-**21** i (*2S,4R*)-**21** przebadano pod kątem powinowactwa do metabotropowych receptorów glutaminergicznych III grupy. Kwas o konfiguracji (*2S,4S*)-**21** wykazywał podobne powinowactwo do receptorów mGluR₁ i mGluR₈, co ich naturalny ligand – kwas L-glutaminowy **19**. Diastereoizomer (*2S,4R*)-**21** był słabszym agonistą w porównaniu z izomerem *treo* (tabela 3).²⁷

Tabela 3. Powinowactwo do glutaminergicznych receptorów metabotropowych wyrażone parametrem EC₅₀ (μmol/l).

receptor	Związki o aktywności agonistycznej		
	(<i>S</i>)- 19	(<i>2S,4R</i>)- 21	(<i>2S,4S</i>)- 21
mGluR _{1a}	3	373	11
mGluR _{8a}	8	69	54

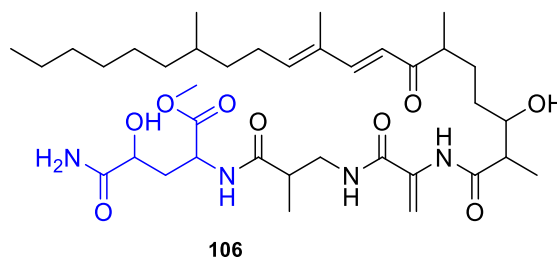
Rośliny z gatunku *Hemerocallis fulva* var. *Sempervirens*,⁸⁵ stosowane w tradycyjnej medycynie japońskiej w leczeniu bezsenności,⁹³ zawierają amid **105**, który wyizolowano także z *Staphylea pinnata* L (rysunek 13). W badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano, że związek **105** zwiększa długość snu wolnofalowego.⁹³



105

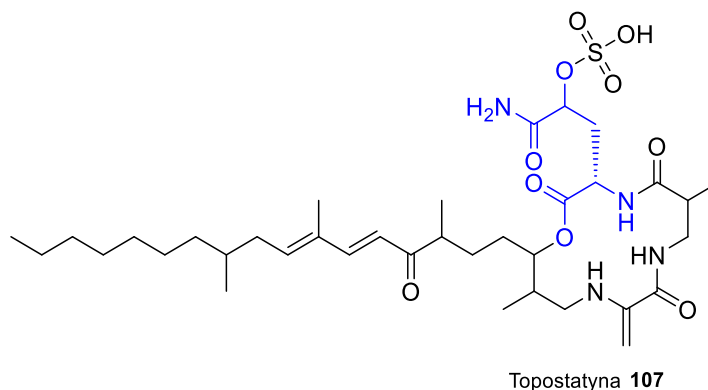
Rysunek 13. Pochodna amidowa kwasu 4-hydroksyglutaminowego **105**.

Pochodna **106**, należąca do związków z grupy lipopeptydów (rysunek 14), została wyizolowana z grzybni szczepu YL-03706F pobranej z próbki martwego drewna w Japonii. Związek **106** - nowej klasy inhibitor biosyntezy ergosterolu - wywoływał zmianę morfologiczną kolonii *Candida tropicalis* w stężeniach do 100 µg/ml.⁹¹



Rysunek 14. Lipopeptyd **106** o aktywności przeciwgrzybiczej.

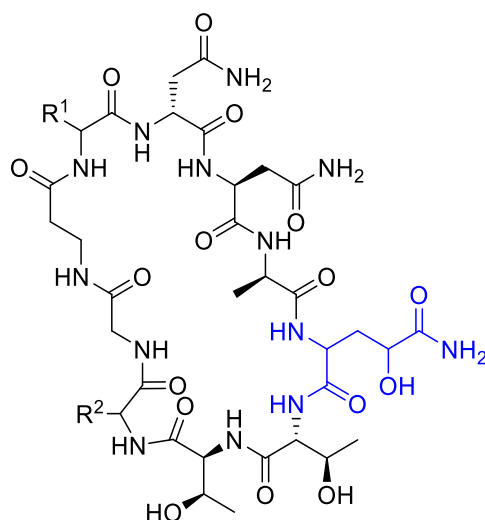
Topostatyna **107** (rysunek 15), wyizolowana ze szczepu bakteryjnego *Thermomonospora alba* nr 1520, wykazała działanie inhibicyjne względem topoisomراز I i II, enzymów biorących udział w replikacji DNA.⁹⁴ Ponadto, nie była cytotoksyczna względem zdrowych komórek ludzkich. Wykazywała wysoką wybiórczość hamowania wzrostu komórek linii SNB-75 i SNB-78, które są komórkami nowotworowymi centralnego układu nerwowego.⁹⁵



Rysunek 15. Struktura cyklicznego lipopeptydu **107** o aktywności cytostatycznej.

Arborkandyny A-F (związki **108** – **113**) są cyklicznymi peptydami wyizolowanymi z kultur pożywki grzyba strzępkowego szczepu Sank 17397, którego próbkę pobrano w prefekturze Yamagutchi i zdeponowano w Narodowym Instytucie Bionauk i Technologii w Japonii (rysunek 16). Wykazują silne działanie inhibicyjne względem syntazy 1,3-betaglukanowej – enzymu biorącego udział w syntezie ściany komórkowej grzybów.⁹⁰ Arborkandyny hamowały syntazy pochodzące od *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus*

($IC_{50} = 0,012 - 3 \mu\text{g/ml}$). Wartości stałej inhibicji K_i arborkandyny C dla *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus* wynosiły odpowiednio $0,012 \mu\text{mol/l}$ oraz $0,016 \mu\text{mol/l}$.

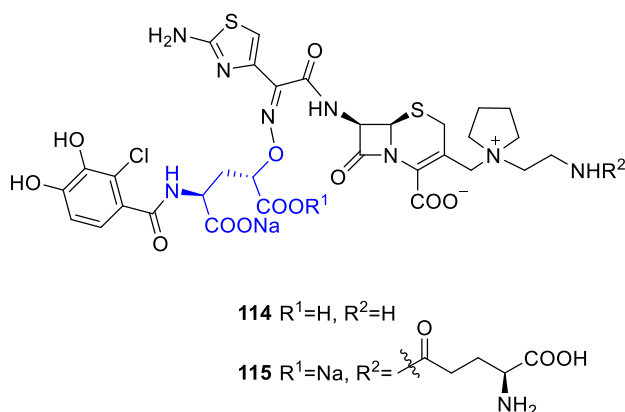


Arborkandyna

- 108** A: $R^1 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, $R^2 = (\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$;
109 B: $R^1 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, $R^2 = (\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$;
110 C: $R^1 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, $R^2 = (\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$;
111 D: $R^1 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, $R^2 = (\text{CH}_2)_7\text{CO}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$;
112 E: $R^1 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$, $R^2 = (\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$;
113 F: $R^1 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$, $R^2 = (\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$

Rysunek 16. Struktury cyklicznych peptydów **108** – **113** o działaniu przeciwgrzybiczym.

W japońskiej firmie farmaceutycznej Shionogi & Co., Ltd opracowano metodę syntezy pochodnych cefemu **114** i **115** modyfikowanych kwasem 4-hydroksylgutaminowym (rysunek 17).



Rysunek 17. Pochodne cefemu **114** i **115** o aktywności przeciwbakteryjnej.

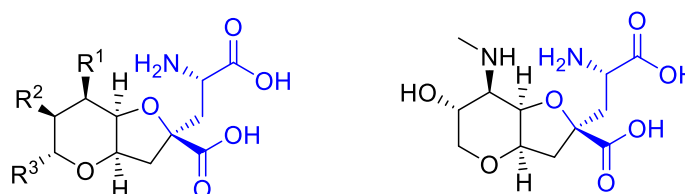
Zbadano aktywność przeciwbakteryjną związków **114** i **115** wobec bakterii Gram-ujemnych: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Wykazywały one działanie bakteriostatyczne w stężeniach 0,25 – 2,0 µg/ml (tabela 4).⁹⁶

Tabela 4. Aktywność przeciwbakteryjna pochodnych cefemu **114** i **115** wyrażona parametrem MIC (µg/ml).

Bakteria (szczep)	związek	
	114	115
<i>Escherichia coli</i> ATCC® BAA-196™	0,25	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603	0,25	1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SR24	0,5	0,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> sr27001 (mdrp, imp-1+)	1,0	2,0

Dysiherbaina **116** (DH) i neodysiherbaina A **117** (NDH) (rysunek 18) są neurotoksycznymi aminokwasami, które zostały wyizolowane z gąbki gatunku *Dysidea herbacea* pochodzącej z Mikronezji.⁹⁷⁻⁹⁹ Związki te wykazywały powinowactwo do receptorów kainowych: GluK₁ oraz GluK₂, należących do rodziny jonotropowych receptorów glutaminergicznych.

Zsyntezowano kilka pochodnych (związki **118** – **123**, rysunek 18), które również wykazywały selektywne powinowactwo względem receptorów kainowych (tabele 5 i 6). Pochodne **118** – **123** wykazywały najlepsze właściwości antagonistyczne względem podtypu receptora GluK₁ (tabela 5).^{100,101}



116 DH R₁=NHCH₃, R²=OH, R³=H

117 NDH R¹R²=OH, R³=H

118 R₁=NHCH₃, R²=H, R³=H

119 R₁=NHCH₃, R²=OCH₃, R³=H

120 R₁=NHC₂H₅, R²=OH, R³=H

121 R₁=NH₂, R²=OH, R³=CH₂OH

122 R₁=OH, R²=OH, R³=CH₂OH

123 R₁=OH, R²=OH, R³=CH₂OCH₃

Rysunek 18. Struktury dysiherbainy **116**, neodysiherbainy A **117** oraz ich syntetycznych pochodnych **118** – **124**.

Tabela 5. Powinowactwo dysiherbainy **116**, neodysiherbainy A **117** i wybranych syntetycznych pochodnych do glutaminergicznych receptorów jonotropowych wyrażone K_i (nmol/l).

związek	receptory KA			receptory AMPA		
	GluK ₁	GluK ₂	GluK ₃	GluK ₅	GluA ₁	GluA ₂
116	0,5	1,3	5,4	43x10 ⁵	-	-
119	7,7	8,4	3005	6,8x10 ⁵	-	-
121	7,2	929	397	>10 ⁷	>10 ⁴	>10 ⁴
122	59	834	>10 ⁴	>10 ⁷	>10 ⁴	10 ⁴
123	10	2426	14530	>10 ⁷	>10 ⁴	>10 ⁴

Tabela 6. Powinowactwo dysiherbainy **116**, neodysiherbainy A **117** i wybranych syntetycznych pochodnych do glutaminergicznych receptorów jonotropowych wyrażone K_i (nmol/l).

związek	receptor	
	AMPA	KA
116	0,153	0,026
121	>10 ^a	>10 ^a
118	>10 ^a	>10 ^a
119	>10 ^a	9,3
120	>10 ^a	8,2

^a Wartości K_i nie były wyznaczane kiedy przekraczały 10 μ mol/l.

Przeprowadzono również badanie toksyczności *in vivo* na myszach poprzez wstrzyknięcie roztworów zawierających związki **116**, **118** – **120** oraz **124** do komory mózgowej zwierząt. *N*-Etylowa pochodna **120** wykazywała podobną aktywność drgawkową do dysiherbainy **116**, mimo że powinowactwo było 10-20-krotne niższe w przypadku dysiherbainy **116**. Podanie pochodnych 9-epi- **124**, 9-deoksy- **118**, i 9-metoksy- **119** również wywoływały drgawki u myszy, jednak aktywność tych związków była niższa niż naturalnie występującego analogu **116** (tabela 7).¹⁰⁰

Tabela 7. Aktywność epileptogenna dysiherbainy **117** i wybranych syntetycznych analogów wyrażona parametrem ED₅₀ (nmol/mysz).

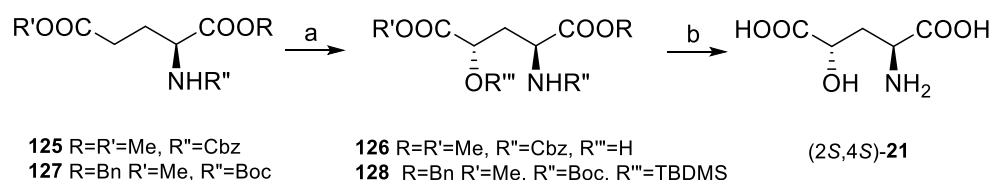
związek	ED ₅₀
116	0,013
118	-
119	7,1
120	0,16
124	29

2.4.2. Synteza kwasu 4-hydroksyglutaminowego

Większość metod otrzymywania kwasów 4-hydroksyglutaminowych **21** opisanych w literaturze opiera się na wykorzystaniu enzymatycznych procesów.^{78,81,102-105} Istnieje kilka metod syntezy wykorzystujących jako materiały wyjściowe aminokwasy białkowe oraz niebiałkowe m.in. kwas glutaminowy, alaninę, hydroksyprolinę oraz kwas piroglutaminowy.

2.4.2.1. Synteza kwasu 4-hydroksyglutaminowego poprzez elektrofilowe hydroksylowanie na atomie C4

Jedną z najprostszych metod syntezy kwasu 4-hydroksyglutaminowego **21** polegała na wykorzystaniu pochodnych kwasu glutaminowego **125** lub **127** (schemat 17). W reakcji oksazyrydyny Davisa [3-fenyl-*N*-fenylosulfonylooksazyrydyna] z anionem enolanowym generowanym *in situ* z pochodnej L-glutaminianu dimetylu **125** lub **127** otrzymano mieszaninę (9 : 1) diastereoizomerycznych pochodnych sfunkcjonalizowanych w pozycji C4, przy czym związki **127** lub **128** tworzyły się jako główne produkty.¹⁰⁸ Przy zastosowaniu enolanów sodu i potasu uzyskano znacznie niższe diastereoselektywności wynoszące odpowiednio 2,6 : 1 i 1 : 1. W wyniku kwasowej hydrolizy diester **126** przekształcono następnie w chlorowoderek odpowiedniego kwasu **21** (schemat 17).

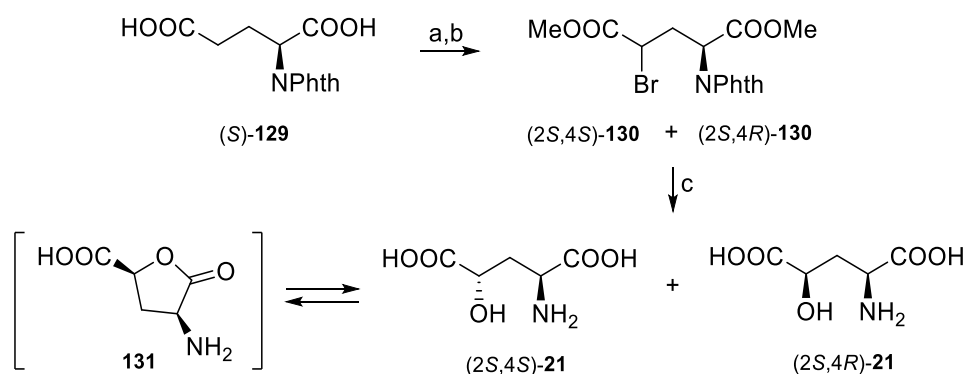


Schemat 17. Synteza kwasu 4-hydroksy-L-glutaminowego (2*S*,4*S*)-**21** poprzez elektrofilową hydroksylację. Odczynniki i warunki reakcji: a. 3-fenyl-*N*-fenylosulfonylooksazyrydyna, potem LiHMDS, THF, -78°C, 70% dla **126**, 68% dla **128**; b. 6M HCl, t. w., 69% z **126**.

2.4.2.2. Synteza kwasu 4-hydroksyglutaminowego poprzez bromowanie kwasu L-glutaminowego

W reakcji bromowania estru metylowego kwasu *N*-ftaloilo-L-glutaminowego (*S*)-**129**, a następnie metanolizy powstała mieszanina diastereoizomerów *treo* (2*S*,4*S*)-**130** i *erythro* (2*S*,4*R*)-**130** (schemat 18).¹⁰⁹ Mieszaninę związków (2*S*,4*S*)-**21** i (2*S*,4*R*)-**21**, otrzymaną w wyniku hydrolizy, rozdzielono wykorzystując dwa zjawiska: preferencyjne

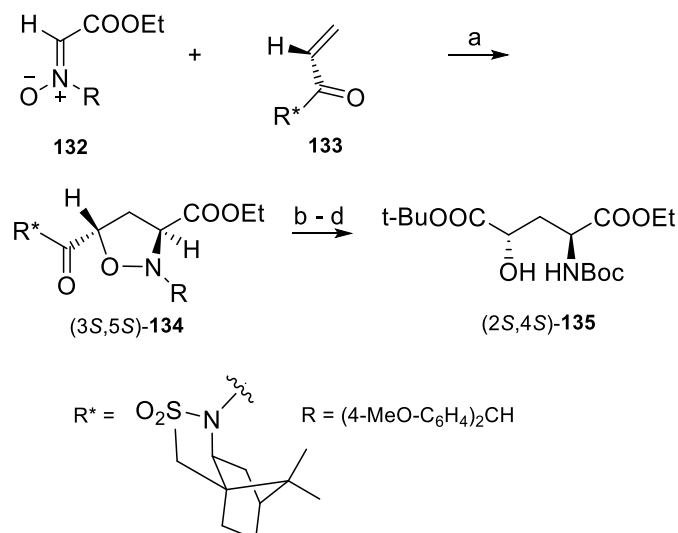
tworzenie laktonu **131** z diastereoizomeru (2*S*,4*S*)-**21** (26%) oraz lepszą rozpuszczalność w wodzie drugiego z diastereoizomerów (2*S*,4*R*)-**21** (15%).¹⁰⁹



Schemat 18. Synteza dwóch stereoizomerów kwasu 4-hydroksyglutaminowego (2*S*,4*S*)- i (2*S*,4*R*)-**21**. Odczynniki i warunki reakcji: a. Br₂, PBr₅, hv, 64-67°C; b. MeOH, t. w., 88%; c. 6 M HCl, potem pirydyna, EtOH/H₂O, 26% dla (2*S*,4*S*)-**21**, 15% dla (2*S*,4*R*)-**21**.

2.4.2.3. Synteza kwasu 4-hydroksyglutaminowego poprzez reakcję cykloaddycji nitronu i odpowiedniego akrylamidu

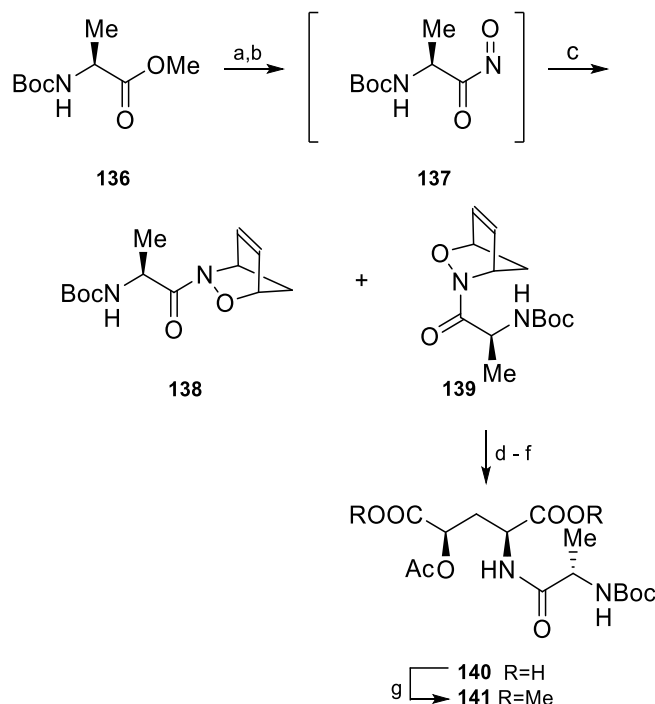
Innym prekursorem kwasu 4-hydroksyglutaminowego może być izoksazolidyna (schemat 19). Zaletami wykorzystania izoksazolidyny jako substratu jest łatwość rozerwania wiązania N–O oraz wysoka diastereoselektywność reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji, w której w przewodzie powstają izomery *trans*, dzięki czemu łatwo można kontrolować stereochemię na atomach C3 i C5.^{110,111} W tym celu mieszaninę *E/Z* nitronu **132** poddano reakcji z akrylamidem **133** otrzymanym z (2*S*)-bornano-10,2-sultamu uzyskując odpowiednie diastereoizomeryczne cykloaddukty **134** (20:1) z przewagą izoksazolidyny (3*S*,5*S*)-**134**. Konfiguracja *trans* pierścienia izoksazolidynowego związku **134** była konsekwencją *endo* i *egzo* addycji odpowiednio do *Z*- i *E*-nitronów.¹¹¹ Dalsze przekształcenia przedstawione na schemacie 19 obejmujące m.in. wprowadzenie grupy *tert*-butylowej na funkcję karboksylową, usunięcie chiralnego pomocnika oraz wodorolityczne otwarcie pierścienia izoksazolidyny doprowadziły do otrzymania ortogonalnie ochronionej pochodnej (2*S*,4*S*)-**135** z całkowitą wydajnością wynoszącą 82%.



Schemat 19. Synteza ortogonalnie ochronionego kwasu 4-hydroksyglutaminowego (2*S*,4*S*)-**135**. Odczynniki i warunki reakcji: a. toluen, 25°C, 82%; b. LiOH, H₂O₂/THF, –15°C, 95%; c. *O*-*tert*-butylo-*N,N'*-diizopropylizomocznik, CuCl; d. H₂, 10% Pd-C, Boc₂O, MeOH, 82% (etapy b-d).

2.4.2.4. Synteza kwasu 4-hydroksyglutaminowego poprzez reakcję Dielsa-Aldera

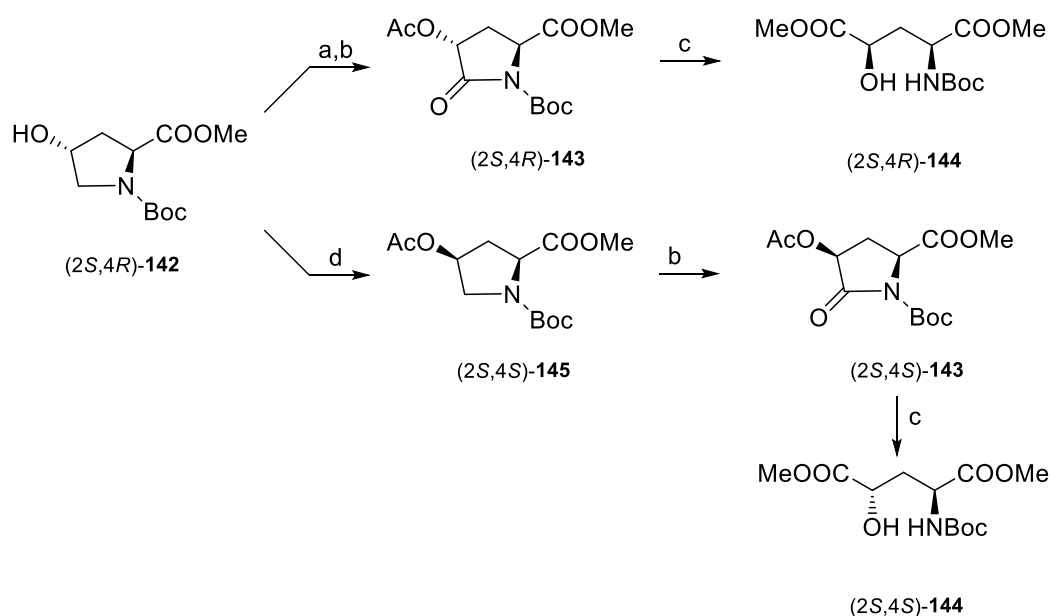
Pochodną **137** otrzymaną z *N*-Boc-L-alaninianu metylu **136** poddano reakcji Dielsa-Aldera z cyklopentadienem uzyskując mieszaninę cykloadduktów **138** i **139** w proporcji 1:3,¹¹² które poddano chromatograficznemu rozdzielaniu (schemat 20).¹¹³ Bicykliczny szkielet w cząsteczce **139** został zredukowany za pomocą heksakarbonylku molibdenu, a na grupę hydroksylową wprowadzono acetylową grupę ochronną. Związek **139** został przekształcony w dikwas **140**, w warunkach utleniających poprzez rozerwanie wiązania C=C, a następnie poddany estryfikacji do diestru metylowego **141**, który oczyszczono na żelu krzemionkowym (wydajność 83% z czterech etapów reakcji).¹¹³



Schemat 20. Synteza kwasu (2*S*,4*R*)-4-acetyloksyglutaminowego w postaci dipeptydu **141**.
 Odczynniki i warunki reakcji: a. NH₂OH, MeOH; b. Bu₄NIO₄, MeOH; c. cyklopentadien, MeOH, 78%; d. Mo(CO)₆, MeCN/H₂O; e. Ac₂O, pirydyna/CH₂Cl₂; f. NaIO₄, RuCl₃, CCl₄/MeCN/H₂O; g. CH₂N₂, eter, 83% (etapy d-g).

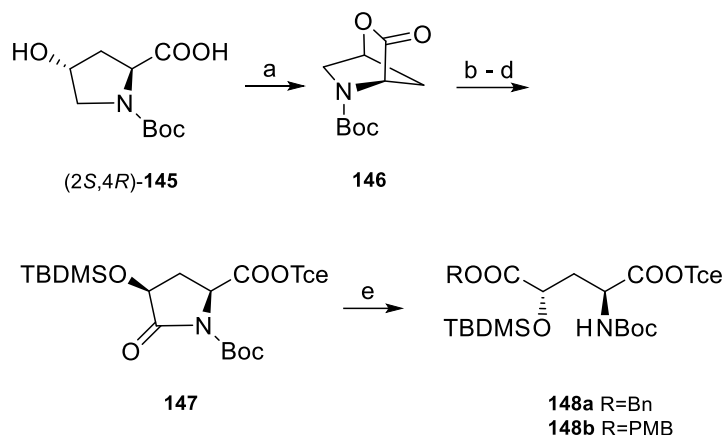
2.4.2.4. Synteza kwasu 4-hydroksyglutaminowego z 4-hydroksyproliny

4-Hydroksyprolina może być wykorzystana jako wyjściowy materiał w syntezie kwasu 4-hydroksyglutaminowego, poprzez otrzymanie jego prekursora – pochodnej kwasu 4-hydroksypiroglutaminowego **143** (schemat 21). *N*-Boc pochodną **142** poddano reakcji acetylowania uzyskując ilościowo octan. Kluczowym etapem syntezy była reakcja utleniania tlenkiem rutenu(IV) prowadząca do otrzymania pochodnej γ -laktamu (2*S*,4*R*)-**143** z wydajnością powyżej 95%. *N*-Boc-4-hydroksyglutaminian dimetylu (2*S*,4*R*)-**144** otrzymano w wyniku otwarcia pierścienia w zasadowych warunkach.¹¹⁴ W celu otrzymania diastereoizomeru (2*S*,4*S*)-**144** należało dokonać inwersji konfiguracji na atomie C4 w reakcji Mitsunobu uzyskując pochodną **145**, którą następnie poddano utlenianiu do związku (2*S*,4*S*)-**143**. W końcowym etapie przeprowadzono otwarcie pierścienia γ -laktamowego otrzymując związek (2*S*,4*S*)-**144** (schemat 21).⁶²



Schemat 21. Synteza *N*-blokowanego estru dimetylowego (2*S*,4*R*)- i (2*S*,4*S*)-**144** z pochodnej (2*S*,4*R*)-4-hydroksyproliny **142**. Odczynniki i warunki reakcji: a. Ac₂O, pirydyna, 100%; b. RuO₂, NaIO₄, AcOEt/H₂O, >95%; c. MeOH, K₂CO₃, >95%; d. AcOH, Ph₃P, DEAD, THF, >95%.

Inną metodologię również wykorzystującą 4-hydroksyprolinę zastosowano w syntezie pochodnej kwasu (2*S*,4*R*)-4-hydroksyglutaminowego **145**, który był produktem pośrednim w syntezie antybiotyku – nosiheptydu (schemat 22).^{115,116} *N*-*tert*-Butoksykarbonylową pochodną (2*S*,4*R*)-4-hydroksyproliny **145** poddano reakcji Mitsunobu, w wyniku której nastąpiła inwersja konfiguracji na atomie C4 poprzez wewnątrzcząsteczkową laktonizację prowadzącą do otrzymania produktu **146**. Otwarcie pierścienia laktonowego przeprowadzono za pomocą trichloroetanolu, a na grupę hydroksylową wprowadzono osłonę *tert*-butylodimetylosililową. W kolejnym etapie, przeprowadzono utlenianie za pomocą tlenku rutenu(IV) i nadjodanu sodu prowadzące do otrzymania piroglutaminowej pochodnej **147**. Ester benzylowy **148a** lub *p*-metoksybenzylowy **148b** otrzymano w wyniku otwarcia piroglutaminianu **147** w zasadowych warunkach.¹¹⁶

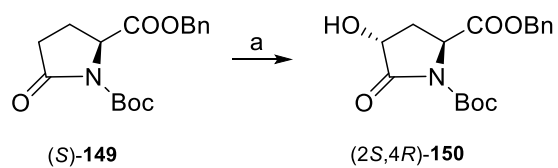


Schemat 22. Synteza ortogonalnie ochronionej pochodnej $(2S,4S)$ -**148** z N -Boc- $(2S,4R)$ -4-hydroksyproliny **145**. Odczynniki i warunki reakcji: a. Ph_3P , DEAD, THF, 62%; b. $\text{Cl}_3\text{CCH}_2\text{OH}$ (TceOH), NaH, THF; c. t -BuMe₂SiCl, imidazol, DMF; d. RuO₂, NaIO₄, CCl₄/MeCN/H₂O, 52%; e. BnOH lub p -MeO-C₆H₄-CH₂OH, NaH, THF, 87 – 90%.

2.4.2.5. Synteza kwasu 4-hydroksyglutaminowego z kwasu piroglutaminowego

4-Hydroksyprolina jest prekursorem w syntezie kwasu 4-hydroksyglutaminowego **21**, ale ze względu na obecność 2 centrów stereogenicznych, dostępność jej wybranych stereoisomerów może być ograniczona. W takim przypadku można zastosować asymetryczną syntezę enancjomerycznych 4-hydroksypiroglutaminianów wykorzystując reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji homochiralnych nitronów i akrylanów (schemat 19, str. 46) lub reakcję Dielsa-Aldera nitrozozwiązków (schemat 20, str. 47). Jednakże w porównaniu z tymi wieloetapowymi syntezami hydroksylowanie pochodnej kwasu piroglutaminowego jest najprostszą opcją. W reakcji oksazyrydiny Davisa z solą litową enolanu N -Boc-piroglutaminianu benzylu (S) -**149** uzyskano pochodną $(2S,4R)$ -**150** (schemat 23).¹¹⁷⁻¹¹⁹ Analiza mieszaniny poreakcyjnej za pomocą HPLC nie wykazała obecności drugiego diastereoizomeru, tj. związku $(2S,4S)$ -**150**.¹¹⁷ Stereospecyficzne hydroksylowanie, ze względu na zawadę steryczną spowodowaną obecnością grupy benzyloksykarbonylowej, zachodziło jedynie po stronie *re* enolanu.

Warto nadmienić, że w zależności od rodzaju użytego substratu hydroksylowanie enolanami litu przebiegało z różną stereoselektywnością. W przypadku reakcji z piroglutaminianem otrzymano pojedynczy diastereoizomer o konfiguracji *R* na atomie węgla C4, a przypadku zastosowania glutaminianu otrzymano mieszaninę diastereoizomerów w stosunku 9 : 1, z przewagą izomeru o konfiguracji *S* na nowo utworzonym centrum stereogenicznym.



Schemat 23. Synteza benzylovej pochodnej kwasu 4-hydroksypiroglutaminowego (2*S*,4*R*)-**150** poprzez elektrofilowe hydroksylowanie. Odczynniki i warunki. a. LiHMDS, THF, potem 3-fenyl-*N*-fenylosulfonylooksaazyrydyna, -78°C , 55%

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

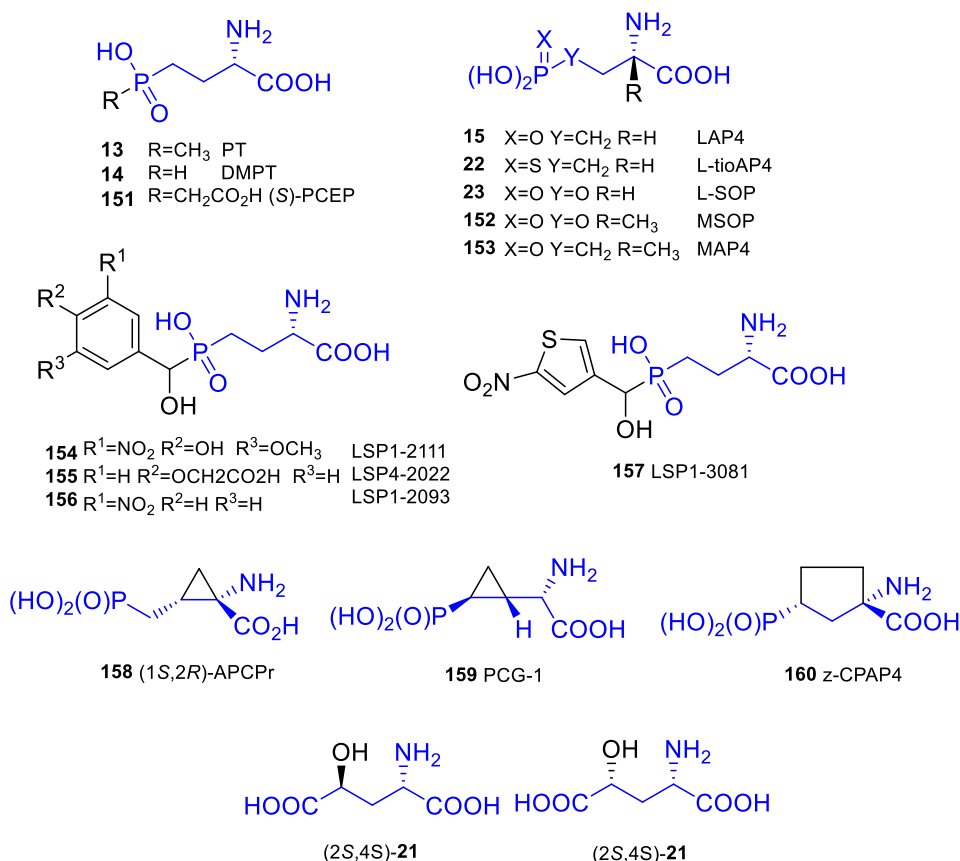
3. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

3.1. Założenia projektu i plan pracy

Aktywność biologiczna związków posiadających w swoim szkielecie kwas L-glutaminowy zainspirowała mnie do zaprojektowania nowych fosfonowych pochodnych kwasów 1-amino-3-hydroksy(amino)karboksylowych.

Dotychczas w literaturze opisano kilkanaście fosfonowych analogów kwasu glutaminowego wykazujących różnorodną aktywność biologiczną m.in. chwastobójczą,¹²⁰ przeciwbakteryjną^{121,122} i przeciwgrzybiczą.^{123,124} Pochodne kwasu glutaminowego, zarówno z dodatkowym podstawnikiem w pozycji γ jak i z ugrupowaniem fosfonowym wprowadzonym w miejsce grupy karboksylowej, były aktywne wobec metabotropowych receptorów glutaminergicznych (rysunek 19), stanowiących potencjalne cele terapeutyczne w poszukiwaniu nowych substancji w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, depresji, epilepsji, a także zaburzeń lękowych.¹²⁵

Pierwszym opisanym selektywnym agonistą dla glutaminergicznych receptorów metabotropowych III grupy był kwas L-2-amino-4-fosfonobutanowy (LAP4) **15**. Nie był jednak selektywny względem podtypów receptorów mGluR₄ oraz mGluR₆₋₈.^{21,29,45} W następnych latach zsyntezowano kolejne fosfonowe analogi kwasu glutaminowego (rysunek 19). Większość z nich wykazuje aktywność agonistyczną względem mGluR. Wyjątek stanowią związki MSOP **152** i MAP4 **153**, które są antagonistami dla receptorów mGluR III grupy (tabela 8).



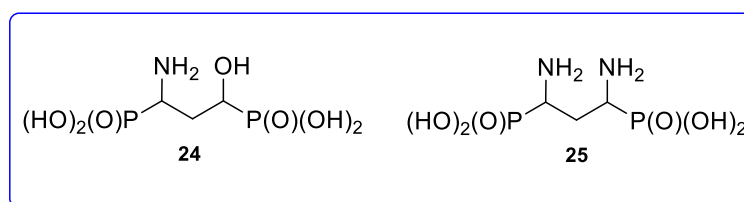
Rysunek 19. Wybrane pochodne kwasu glutaminowego wykazujące powinowactwo do glutaminergicznych receptorów metabotropowych.

Tabela 8. Powinowactwo kwasu glutaminowego **19** i jego wybranych pochodnych do receptorów mGluR wyrażone parametrem EC₅₀, K_i^a lub *IC₅₀ (μmol/l)[†]

Związek	Grupa I		Grupa II		Grupa III			
	mGluR ₁	mGluR ₅	mGluR ₂	mGluR ₃	mGluR ₄	mGluR ₆	mGluR ₇	mGluR ₈
19 ^{29,45}	1-13	3-11	0,3-12	2-9	3-17	5-38	2,3·10 ³	8-10
15 ^{29,45}	> 10 ³	>10 ³	> 10 ³	> 10 ³	0,2-1,2	0,6-0,9	160-500	0,06-0,9
22 ²²	b. e.	b. e.	b. e.	b. e.	0,04	0,7	200	0,05
14 ²²	-	-	-	-	4,05	27,8	>500	1,72
13 ²²	-	-	-	-	>500	>500	>500	412
23 ^{29,45}	b. e.	b. e.	ant.	ant.	1-4	3	160-1200	2
158 ¹²⁶	-	-	-	-	0,6	1,9	602	0,3
160 ¹²⁷	-	-	-	-	49	-	b. e.	124
157 ¹²⁸	b. e.	b. e.	b. e.	b. e.	0,16	3,3	419	0,51
154 ¹²⁹	b. e.	b. e.	b. e.	b. e.	2,2	1,7	53	66
156 ¹³⁰	-	-	-	-	0,55	8,81	>10 ³	1,53
155 ¹³¹	b. e.	b. e.	b. e.	b. e. ^r	0,11	4,2	12	29
159 ¹³²	> 10 ³	> 10 ³	> 10 ³	-	9,4	13	700	63 ^a
(2S,4R)-21 ²⁷	373	-	161	-	-	-	-	69
(2S,4S)-21 ²⁷	11	-	137	-	-	-	-	53
153 ^{*45,133}	b. e.	-	500	-	90-190	-	-	25-105
154 ^{*134-136}	-	-	5,3 ^a	-	-	4,1	ago.	5,3

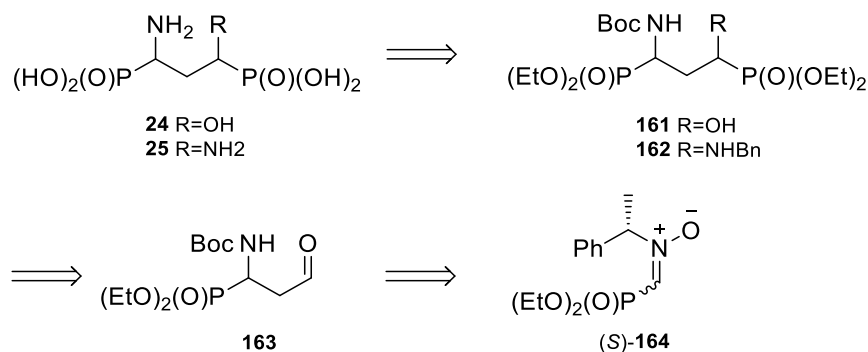
[†]Wartości EC₅₀, K_i lub IC₅₀ były mierzone dla szczurzych sklonowanych receptorów. ant. - antagonist; ago. - agonista; a- wartość K_i; b. e. - brak efektu.

Mając na uwadze powyższe informacje zaprojektowałam analogi kwasu glutaminowego, w którym obie grupy karboksylowe zastąpione zostały fosfonowymi, tj. związki **24** i **25** (rysunek 20). Ugrupowanie fosfonowe, w przeciwieństwie do płaskiej grupy karboksylowej, posiada tetraedryczną geometrię przypominającą stan przejściowy w reakcji hydrolizy wiązania amidowego lub estrowego, co zostało z powodzeniem wykorzystane w projektowaniu izosterów stanu przejściowego.¹³⁷⁻¹⁴⁰ Ponadto reszta kwasu fosfonowego ze względu na obecność dwóch grup OH może tworzyć silniejsze oddziaływania w miejscu aktywnym receptora.¹⁴¹ Zaprojektowane związki, ze względu na wprowadzenie dodatkowego podstawnika aminowego lub hydroksylowego, posiadają dwa centra stereogeniczne. Założyłam, że wprowadzenie dodatkowych podstawników poprzez zmianę właściwości fizykochemicznych, może spowodować istotne zmiany w oddziaływaniu z enzymami lub receptorami. Ponieważ stereoizomery różniące się konfiguracją absolutną mogą wykazywać inną aktywność biologiczną, zamierzałam otrzymać wszystkie możliwe stereoizomery, cztery dla związku **24** i trzy dla **25**.



Rysunek 20. Struktury zaprojektowanych difosfonowych analogów γ -podstawionego kwasu glutaminowego.

Uznałam, że dogodnymi substratami w syntezie pochodnych **24** i **25** będą enancjomerycznie czyste 1-(*N*-Boc-amino)-3-oksopropylfosfoniany **163**, które w reakcji Abramova z fosforem dietylowym przekształcone zostaną w izomeryczne difosfoniany **161**, zaś w reakcji Kabachnika-Fieldsa z fosforem trietylowym i odpowiednią aminą utworzą związki **162** (schemat 24). Otrzymane diastereoizomery związków **161** i **162** zostaną poddane reakcji hydrolizy do odpowiednich kwasów difosfonowych **24** i **25** (schemat 24). Enancjomerycznie czyste aldehydy (*R*)-**163** i (*S*)-**163** można otrzymać z nitronu (*S*)-**164** zgodnie z metodologią opracowaną wcześniej w naszym zespole.¹⁴²



Schemat 24. Retrosyntetyczny schemat otrzymywania kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych **24** oraz kwasów (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowych **25**.

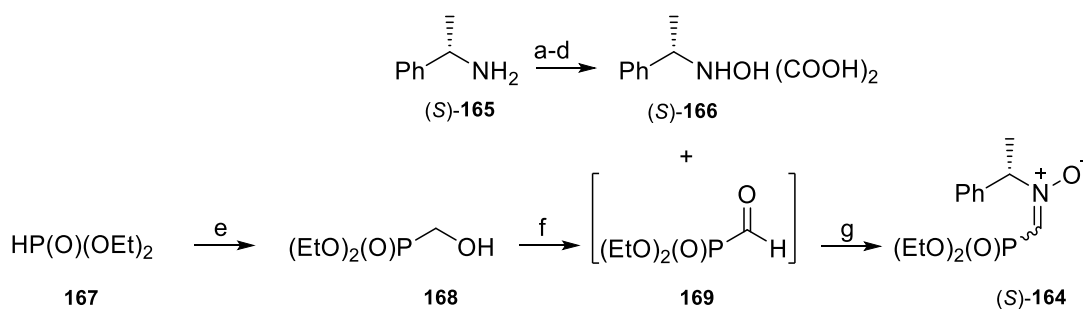
Prace badawcze podzieliłam na 7 kluczowych zadań:

- synteza nitronu (*S*)-**164**,
- synteza enancjomerycznie czystych 1-amino-3-oksopropylfosfonianów dietylu **163**,
- synteza kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych **24**,
- ustalenie konfiguracji absolutnej na atomie C3 w estrach kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych **161**,
- synteza kwasów (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowych **25**,
- ustalenie konfiguracji absolutnej na atomie C3 w estrach kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych **162**,
- przekazanie związków **24** i **25** do badań biologicznych i ocena aktywności na podstawie uzyskanych wyników.

3.2. Synteza nitronu (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-**164**

3.2.1. Synteza (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-**164** (procedura A)

Nitron (*S*)-**164** otrzymałam zgodnie z procedurą literaturową polegającą na addycji hydroksyloaminy (*S*)-**166** do generowanego *in situ* formylofosfonianu dietylu **169**, który z kolei otrzymałam z hydroksymetylofosfonianu dietylu **168** (schemat 25).



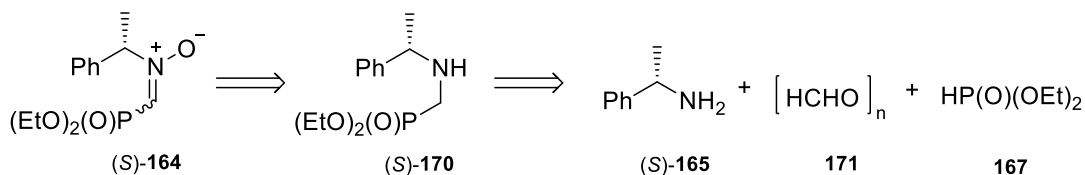
Schemat 25. Synteza (*S*)-*N*-(fenyloetylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-**164**. Odczynniki i warunki reakcji: a. aldehyd *p*-anyżowy, MgSO₄, CH₂Cl₂, t. p. 24 godz.; b. MCPBA, CH₂Cl₂, 0°C→t. p., 3 godz.; c. chlorowodorek hydroksyloaminy, EtOH, 0°C, 24 godz.; d. kwas szczawiowy, Et₂O, 2 godz., t. p., 46% dla (*S*)-**166**; e. paraformaldehyd, K₂CO₃, 70°C, 5 godz., 80% dla **168**; f. DMSO, chlorek oksalilu, -78°C, 4 godz.; g. TEA, 3 godz. t. p., 47%.

Hydroksyloamina (*S*)-**166** niezbędna do zrealizowania przedstawionej powyższej strategii syntezy jest związkiem opisanym w literaturze,¹⁴³ ale niedostępnym komercyjnie, dlatego prace rozpocząłam od jej otrzymania. W tym celu wykorzystywałam kilkuetapową metodologię opracowaną przez Tickella i współpracowników.¹⁴³ (*S*)-*N*-(1-Fenyloetylo)hydroksyloaminę **166** w postaci szczawianu otrzymałam z wydajnością 46%. Strukturę oraz czystość produktu potwierdziłam metodami spektroskopowymi.

Związek **168** otrzymałam z handlowo dostępnego fosforynu dietylowego **167** oraz paraformaldehydu w obecności węgla potasu wykorzystując procedurę literaturową opisaną przez Jeanmaire¹⁴⁴ (schemat 25). Surowy produkt poddałam destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem wyodrębniając czysty hydroksymetylofosfonian dietylu **168** jako bezbarwną ciecz z wydajnością 80%. Następnie alkohol **168** poddałam utlenianiu do aldehydu **169** w warunkach reakcji Swerna. Otrzymany aldehyd **169** poddałam *in situ* reakcji ze szczawianem *N*-(1-fenyloetylo)hydroksyloaminy (*S*)-**166** (schemat 25). Po wstępnym oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej typu Flash, a następnie krystalizacji otrzymałam czysty nitron (*S*)-**164** z wydajnością wynoszącą 47%.

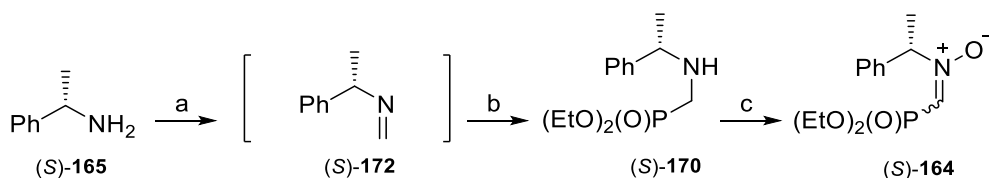
3.2.3. Synteza (*S*)-*N*-(1-fenyloetylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-**164** (procedura B)

Gella i współpracownicy opisali wykorzystanie oksonu w utlenianiu drugorzędowych amin do odpowiednich nitronów.¹⁴⁵ Praca ta zainspirowała mnie do opracowania alternatywnej ścieżki syntezy nitronu (*S*)-**164**. Uznałam, że dogodnym substratem do utleniania za pomocą oksonu będzie α-aminometylofosfonian (*S*)-**170**, który można łatwo otrzymać w trójskładnikowej reakcji Kabachnika-Fieldsa lub w reakcji aza-Pudovika z odpowiedniej iminy (schemat 26).



Schemat 26. Schemat retrosyntetyczny otrzymywania nitronu w reakcji utleniania za pomocą oksonu.

Realizując powyższe założenia, przeprowadziłam addycję (*S*)-*N*-1-fenyletyloaminy (*S*)-165 do paraformaldehydu 171¹⁴⁶, a otrzymaną iminę (*S*)-172 poddałam *in situ* reakcji azapudovika z fosforem dietylowym (schemat 27).¹⁴⁶ Analiza widma ³¹P NMR surowej mieszaniny wykazała obecność sygnału przy $\delta = 26,68$ ppm, który przypisałam związkowi (*S*)-170. Kolejnym etapem była reakcja utleniania za pomocą oksonu. Początkowo zastosowałam procedurę opracowaną przez Gelle, ale bez dodatku wersenianu disodowego. W widmie ³¹P NMR zaobserwowałam dużą liczbę sygnałów pochodzącą od niezidentyfikowanych produktów, dlatego postanowiłam zmodyfikować warunki reakcji. Surowy aminometylofosfonian (*S*)-170 utleniałam wykorzystując metodologię opisaną przez Shioji i współpracowników adaptując procedurę opracowaną oryginalnie do utleniania tlenku [2-(benzyloamino)propan-2-ylo]difenylofosfiny do odpowiedniego nitronu.¹⁴⁷ W widmie ³¹P surowej mieszaniny zaobserwowałam sygnały od mieszaniny izomerów *E*- i *Z*-nitronu (*S*)-164 (δ [ppm] = 6,22 oraz 5,40 w proporcjach 94:6) oraz sygnały od niezidentyfikowanych produktów. Czysty nitron (*S*)-164 otrzymałam z wydajnością 80% (z dwóch etapów).



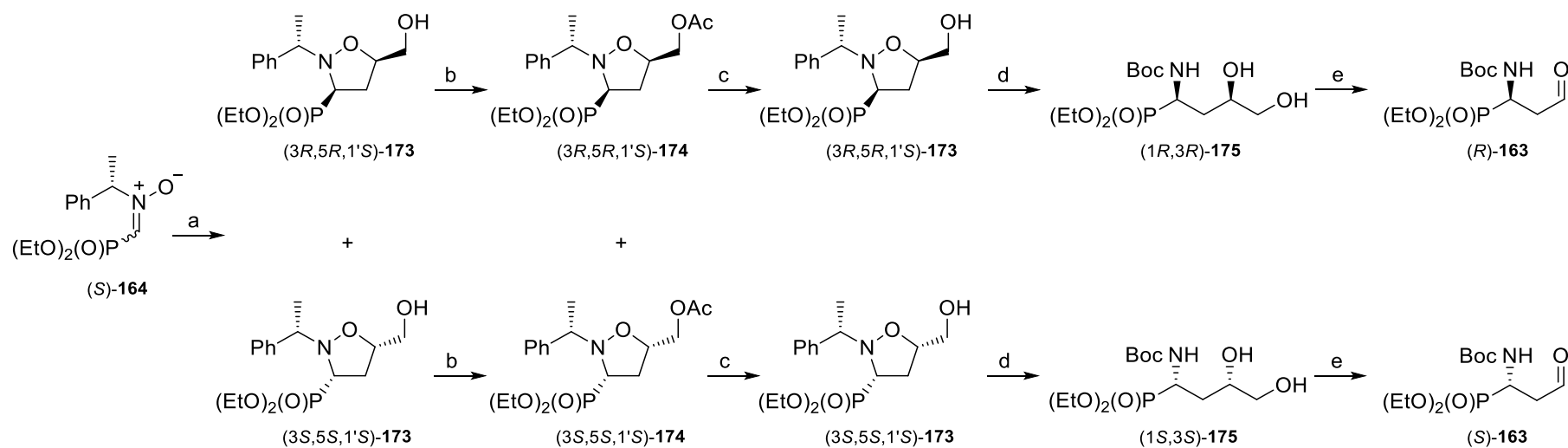
Schemat 27. Synteza (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietylofosforylo)nitronu (*S*)-164 - procedura B. Odczynniki i warunki reakcji: a. paraformaldehyd, AcOH, toluen, 1 godz., 80°C; fosfor dietylowy, t. w., 5 godz.; c. okson, NaHCO₃, CH₃C(O)CH₃, H₂O, t. p., 1 godz., 80%.

W dotychczas stosowanej procedurze, którą opracowano w naszym zespole, synteza enancjomerycznie czystego nitronu (*S*)-164 wymagała otrzymania odpowiedniej soli hydroksyloaminy oraz zastosowania restrykcyjnych warunków reakcji Swerna. Procedura opracowana przeze mnie nie wymaga stosowania niskiej temperatury, skraca czas syntezy i zapewnia wyższą sumaryczną wydajność (22% vs. 80% względem aminy (*S*)-165).

3.3. Synteza 1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonianu dietylu (*R*)-163 i (*S*)-163

3.3.1. Synteza (*R*)- i (*S*)-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonianu dietylu

Enancjomerycznie czyste 1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfoniany dietylu (*R*)-163 i (*S*)-163 otrzymuje się z nitronu (*S*)-166 w wyniku sekwencji reakcji przedstawionych na schemacie 28.¹⁴⁸ Zgodnie ze schematem w pierwszej kolejności przeprowadziłam syntezę izoksazolidyn (*3R,5R,1'S*)-173 i (*3S,5S,1'S*)-173, które powstają w proporcji 1:1 w wyniku stereoselektywnej reakcji cykloaddycji [3+2] nitronu (*S*)-164 do alkoholu allilowego w obecności generowanego *in situ* eteratu bromku magnezu jako katalizatora (wydajność reakcji 90%).¹⁴⁸ W celu rozdzielenia diastereoizomerów, mieszaninę izoksazolidyn 173 przekształciłam w odpowiednie acetylowe pochodne (*3R,5R,1'S*)-174 oraz (*3S,5S,1'S*)-174, a otrzymaną mieszaninę diastereoizomerów rozdzieliłam chromatograficznie uzyskując czyste związki (*3R,5R,1'S*)-174 oraz (*3S,5S,1'S*)-174 z wydajnościami odpowiednio 25% i 19% (schemat 28).¹⁴⁸ Następnie octany (*3R,5R,1'S*)-174 i (*3S,5S,1'S*)-174 poddałam amonolizie uzyskując wyjściowe izoksazolidyny (*3R,5R,1'S*)-173 i (*3S,5S,1'S*)-173 z wydajnościami odpowiednio 91% i 93%. Związki oczyściłam na kolumnie chromatograficznej, a czystość i struktury potwierdziłam metodami spektroskopowymi.¹⁴² Następnie, izoksazolidynę (*1R,3R,1'S*)-165 w warunkach wodorolitycznych w obecności diwęglanu di-*tert*-butylu przekształciłam w aminodiol (*1R,3R*)-175 z wydajnością 72%.^{142,148} W analogiczny sposób z (*3S,5S,1'S*)-174 otrzymałam enancjomeryczny diol (*1S,3S*)-175 z wydajnością 68%. W kolejnym etapie aminodirole (*1R,3R*)-175 i (*1S,3S*)-175 poddałam reakcji utleniania do odpowiednich aldehydów (*R*)-163 i (*S*)-163 za pomocą nadjodanu sodu.¹⁴² Związki (*R*)-163 i (*S*)-163 otrzymałam z wydajnościami 93%, ich strukturę i czystość potwierdziłam metodami spektroskopowymi, a następnie bez oczyszczania wykorzystałam w kolejnych etapach projektu.



Schemat 28. Synteza enacjomerycznie czystych 1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonianów dietylu (*R*)-**163** i (*S*)-**163**. Odczynniki i warunki reakcji a. MgBr₂-eterat, alkohol allilowy, Et₂O, 24 godz. t. p., 90%; b. Ac₂O, Et₃N, DMAP, 2 godz. t. p., 25% dla (*3R,5R,1'S*)-**174**, 19% dla (*3S,5S,1'S*)-**174**; c. NH₄OH, EtOH, t. p., 4 godz., 91% dla (*3R,5R,1'S*)-**173**, 93% dla (*3S,5S,1'S*)-**173**; d. H₂, 1,01 bar, Pd(OH)₂/C, Boc₂O, EtOH, t. p, 24 godz., 72% dla (*1R,3R*)-**175**, 68% dla (*1S,3S*)-**175**; NaIO₄, H₂O, CH₂Cl₂, t. p., 2 godz., 93% dla (*R*)-**163** i (*S*)-**163**.

3.3.2. Optymalizacja warunków reakcji opisanych w rozdziale 3.3.1.

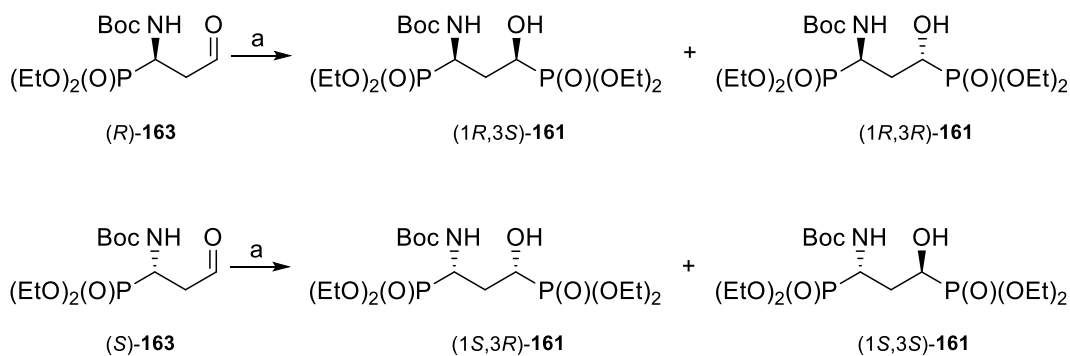
Sekwencja reakcji przedstawiona na schemacie 28 opisująca syntezę związków **163** uwzględnia przekształcenia mieszaniny izoksazolidyn **173** w odpowiednie octany **174** w celu efektywnego rozdzielania diastereoizomerów. Amonoliza pochodnych acetylowych do wyjściowych izoksazolidyn **173**, pozwoliła na uzyskanie poszczególnych diastereoizomerów (3*R*,5*R*,1'*S*)-**173** oraz (3*S*,5*S*,1'*S*)-**173** z sumarycznymi wydajnościami odpowiednio 20% i 16% (3 etapy).¹⁴⁸ Efektywnego rozdzielania mieszaniny diastereoizomerycznych izoksazolidyn **173** dokonałam wykorzystując półpreparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) stosując izokratyczną elucję w układzie woda-izopropanol (86,5 : 13,5, v/v). Rozdzielenie związków za pomocą HPLC wymagało wprawdzie użycia kosztowej aparatury, ale pozwoliło na pominięcie dwóch etapów reakcji i wykorzystane zostały bardziej przyjazne środowisku rozpuszczalniki. Uzyskałam izoksazolidyny **173** z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 38% dla diastereoizomeru (3*R*,5*R*,1'*S*)-**173** ($t_R = 15,26$) i 33%, dla (3*S*,5*S*,1'*S*)-**173** ($t_R = 18,80$).

Zoptymalizowałam również warunki wodorolitycznego otwarcia izoksazolidyn przeprowadzając reakcję w reaktorze ciśnieniowym. Reakcje prowadziłam pod ciśnieniem 12 barów, monitorując postęp za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). W celu zapewnienia lepszego mieszania w reaktorze, zastosowałam 6-krotnie rozcieńczenie w porównaniu z procedurą literaturową. Przy zastosowaniu palladu jako katalizatora w widmach ³¹P NMR surowych produktów reakcji obserwowałam dwa sygnały przy $\delta = 25,78$ ppm (od odpowiedniego *N*-Boc-aminodiolu (1*R*,3*R*)-**175** albo (1*S*,3*S*)-**175** oraz niezidentyfikowanego związku przy $\delta = 22,50$ ppm powstające w proporcji 1 : 0,12). Natomiast reakcja wodorolizy w reaktorze z użyciem wodorotlenku palladu pozwoliła na niemalże ilościowe uzyskanie odpowiedniego *N*-Boc-aminodiolu - [(1*R*,3*R*)-**175** i (1*S*,3*S*)-**175**, z wydajnościami odpowiednio 99% i 95%]. Ponadto w porównaniu z wodorolizą prowadzoną pod normalnym ciśnieniem czas reakcji został skrócony z 24 do 15 godzin.

3.4. Synteza enancjomerów kwasu (1-amino-3-hydroksypropan-1,3-diylo)difosfonowego (1*R*,3*S*)-**24**, (1*S*,3*R*)-**24**, (1*R*,3*R*)-**24**,(1*S*,3*S*)-**24**, (1*R*,3*S*)-**24a**, (1*S*,3*R*)-**24a**, (1*R*,3*R*)-**24a** oraz (1*S*,3*S*)-**24a**

3.4.1. Synteza (1-*tert*-butoksykarbonyloamino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonianu tetraetylu (1*R*,3*S*)-**161** i (1*R*,3*R*)-**161** oraz (1*S*,3*R*)-**161**, (1*S*,3*S*)-**161**

Difosfoniany (1*R*,3*S*)-**161** i (1*R*,3*R*)-**161** otrzymałam w warunkach reakcji Abramova odpowiedniego aldehydu **163** z fosforem dietylowym (schemat 29).¹⁴⁹ Ponieważ aldehydy **163** użyte zostały bez oczyszczania, początkowo zastosowałam niedomiary fosforu dietylowego (0,95 equiv).¹⁵⁰ Reakcję prowadziłam w temperaturze pokojowej bez rozpuszczalnika z dodatkiem katalitycznych ilości trietyloaminy, monitorując postęp reakcji za pomocą widm ³¹P NMR. Brak sygnału pochodzącego od fosforu dietylowego zaobserwowałam dopiero po 29 dniach, przyczyną tak długiego czasu reakcji były prawdopodobnie niedostateczne mieszanie, ponieważ reakcję prowadziłam bez rozpuszczalnika, oraz parowanie i skraplanie trietyloaminy na ściankach kolbki. Ponadto, nie udało się oddzielić nieprzereagowanego aldehydu od mieszaniny powstałych diastereoizomerów **161**. Zastosowanie 5-krotnego nadmiaru fosforu dietylowego pozwoliło skrócić czas reakcji do 48 godzin. W widmie ³¹P NMR surowego produktu reakcji zaobserwowałam dwa dublety przy δ [ppm] = 24,60 (d, ⁴J_{PCCCP} = 8,0 Hz) i 24,01 (d, ⁴J_{PCCCP} = 8,0 Hz) od odpowiednich diastereoizomerów **161**, dwa singlety przy δ [ppm] = 25,26 i 23,58 oraz sygnał pochodzący od użytego w nadmiarze fosforu dietylowego (δ = 7,26 ppm). Mieszaninę fosfonianów (1*R*,3*S*)-**161**, (1*R*,3*R*)-**161** powstających w stosunku 1 : 1 próbowałam rozdzielić na kolumnie chromatograficznej stosując układy chloroform-metanol, chloroform-izopropanol, chlorek metylenu-metanol, chlorek metylenu-izopropanol, niestety bezskutecznie. Wydzieliłam jedynie czystą mieszaninę diastereoizomerów **161** z wydajnością 76%. Próby rozdzielania diastereoizomerów za pomocą półpreparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych również okazały się niezadowolające ze względu na tzw. „ogonowanie” pików (ciągnięcie i poszerzenie pików analizowanych substancji). Udało mi się jedynie wydzielić frakcje wzbogacone w jeden z diastereoizomerów (do 89%).



Schemat 29. Synteza [1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-hydroksypropano-1,3-diylo]difosfonianu tetraetylu (*1R,3S*-**161** i (*1R,3R*-**161**). Odczynniki i warunki reakcji: a. fosforyn dietylu, Et₃N, t. p., 48 godz., 76% dla mieszaniny (*1R,3S*-**161** i (*1R,3R*-**161**, 72% dla mieszaniny (*1S,3R*-**161**, (*1S,3S*-**161**.

Mieszaninę diastereoizomerów (*1S,3S*-**161**, (*1S,3S*-**161** otrzymałam w analogiczny sposób stosując jako substrat aldehyd (*S*)-**163** (wydajność 72%).

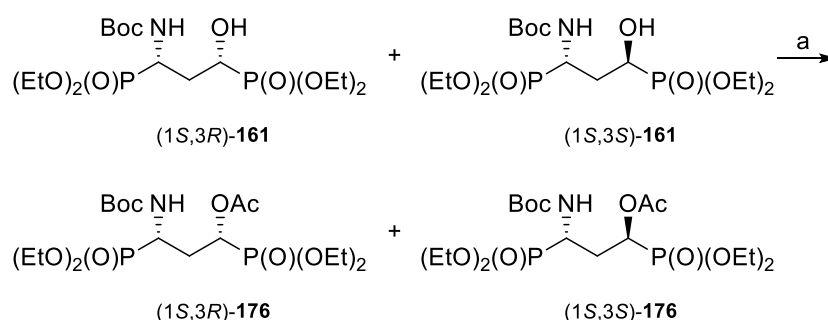
3.4.2. Synteza estrów – rozdział diastereoizomerów

Rozdzielenie diastereoizomerów za pomocą techniki HPLC jest utrudnione ze względu na zbyt małe różnice w powinowactwie sorpcyjnym, szczególnie w przypadku związków posiadających łańcuch alifatyczny.^{151,152} Problem związany z tzw. „ogonowaniem” pików na kolumnie HPLC często rozwiązuje się przez dodatek kwasu trifluorooctowego (TFA) do fazy ruchomej. Kwas trifluorooctowy może powodować uprotonowanie atomów np. azotu grupy aminowej, a następnie dodatkowo jony CF₃COO⁻ mogą solwatować dodatnio spolaryzowane fragmenty cząsteczek na zasadzie tworzenia par jonowych, dzięki czemu zwiększają się oddziaływania hydrofobowe z wypełnieniem kolumny.¹⁵² Niestety w przypadku związków **161** próby ich rozdzielania przy zastosowaniu dodatku kwasu trifluorooctowego do fazy mobilnej nie powiodły się, ze względu na kwasolabilny charakter *tert*-butoksykarbonylowej grupy ochronnej. W celu poprawy skuteczności rozdzielania fosfonianów postanowiłam przekształcić je w odpowiednie estry, aby zwiększyć hydrofobowość pochodnych.

3.4.2.1. Synteza (1-*tert*-butoksykarbonyloamino-3-acetoksypropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu (*1R,3S*-**176**, (*1R,3R*-**176**, (*1S,3R*-**176** i (*1S,3S*-**176**

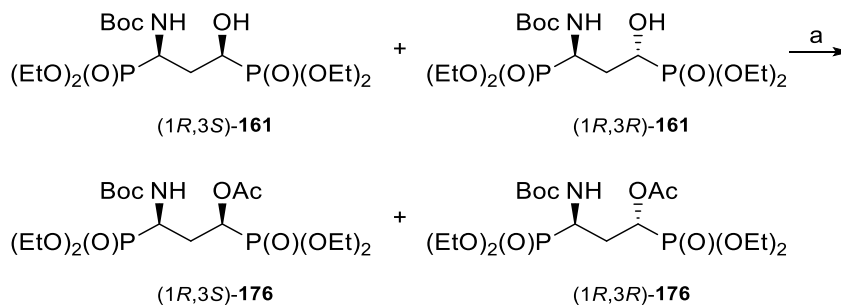
Mieszaninę diastereoizomerów (*1S,3R*-**161** oraz (*1S,3S*-**161** (1:1) przekształciłam w odpowiednie octany (*1S,3R*-**176** i (*1S,3S*-**176** (schemat 30). Surowy produkt wstępnie oczyściłam na żelu krzemionkowym stosując jako eluent układ chloroform-izopropanol (50 : 1, v/v). W widmie ³¹P NMR mieszaniny poreakcyjnej zaobserwowałam sygnały

pochodzące od utworzonych *O*-acetylowych pochodnych (1*S*,3*R*)-**176** i (1*S*,3*S*)-**176**; po dwa dublety od każdego z diastereoizomerów, tj. δ [ppm]= 23,55 (d, $^4J_{\text{PCCCP}}=4,2$ Hz) i 19,83 (d, $^4J_{\text{PCCCP}}=4,2$ Hz) dla izomeru (1*S*,3*R*)-**176** oraz δ [ppm]= 24,42 (d, $^4J_{\text{PCCCP}}=7,9$ Hz) i 20,54 (d, $^4J_{\text{PCCCP}}=7,9$ Hz) dla związku (1*S*,3*S*)-**176**. Wykorzystując RP-HPLC, stosując elucję izokratyczną w układzie woda-acetonitryl (70 : 30, v/v) z przepływem 17 ml/min, wydzieliłam diastereoizomer (1*S*,3*R*)-**176** o czasie retencji $t_R = 10,69$ z wydajnością 20% jako żółty olej oraz diastereoizomer (1*S*,3*S*)-**176** o czasie retencji $t_R = 12,67$ z wydajnością 32% w postaci białego osadu. Struktury i czystość otrzymanych związków potwierdziłam metodami spektroskopowymi.



Schemat 30. Synteza [3-acetoksy-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu (1*S*,3*S*)-**176** i (1*S*,3*R*)-**176**. Odczynniki i warunki reakcji: a. Ac₂O, Et₃N, DMAP, 4 godz. t. p., rozdział RP-HPLC, 20% dla (1*S*,3*R*)-**176**, 32% dla (1*S*,3*S*)-**176**.

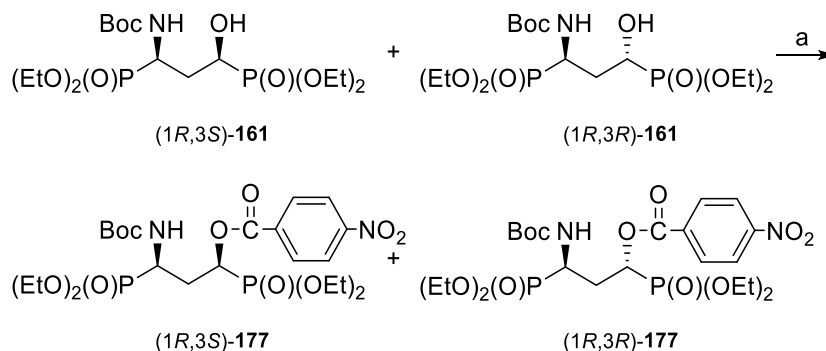
Stosując analogiczną reakcję, otrzymałam octany (1*R*,3*S*)-**176** i (1*R*,3*R*)-**176** (schemat 31). Surową mieszaninę produktów oczyściłam wstępnie na żelu krzemionkowym, a następnie rozdzieliłam za pomocą RP-HPLC. W rezultacie czyste związki (1*R*,3*S*)-**176** i (1*R*,3*R*)-**176** otrzymałam z wydajnościami odpowiednio 22% i 40%.



Schemat 31. Synteza [3-acetoksy-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu (1*R*,3*S*)-**176** i (1*R*,3*R*)-**176**. Odczynniki i warunki reakcji: a. Ac₂O, Et₃N, DMAP, 4 godz. t. p., rozdział RP-HPLC, 22% dla (1*R*,3*S*)-**176**, 40% dla (1*R*,3*R*)-**176**.

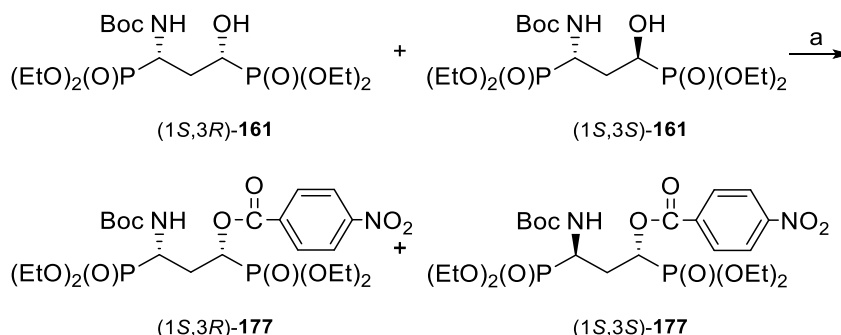
3.4.2.2. Synteza [1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-(4-nitrobenzoilo)propano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu **177**

W poszukiwaniu optymalnych warunków rozdzielania produktów reakcji Abramowa podjęłam również próby przekształcenia ich w pochodne *O*-4-nitrobenzoesowe **177** (schemat 32). W tym celu mieszaninę związków (1*R*,3*S*)-**161** i (1*R*,3*R*)-**161** w stosunku 1 : 1 poddałam reakcji z chlorkiem 4-nitrobenzoilu. Czyste diastereoizomery wydzieliłam za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii kolumnowej w układzie faz odwróconych stosując jako eluent mieszaninę woda-acetonitryl (62 : 38, v/v). Otrzymałam 4-nitrobenzoesan (1*R*,3*S*)-**177** (*t_R* = 14,89) z wydajnością 21% jako żółty olej oraz diastereoizomer (1*R*,3*R*)-**177** (*t_R* = 18,14) z wydajnością 31% w postaci białego ciała stałego.



Schemat 32. Synteza [1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-(4-nitrobenzoilo)propano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu (1*R*,3*S*)-**177** i (1*R*,3*R*)-**177**. Odczynniki i warunki reakcji: a. chlorek 4-nitrobenzoilu, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 4 godz., t. p., rozdział RP-HPLC, 21% dla (1*R*,3*S*)-**177**, 33% dla (1*R*,3*R*)-**177**.

Analogiczną procedurę zastosowałam do otrzymania *O*-4-nitrobenzoesanów (1*S*,3*R*)-**177** i (1*S*,3*S*)-**177** (schemat 33), które wydzieliłam z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 14% i 17%.



Schemat 33. Synteza [1-*tert*-butoksykarbonyloamino-3-(4-nitrobenzoilo)propano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu (1*S*,3*S*)-**177** i (1*S*,3*R*)-**177**. Odczynniki i warunki reakcji: a. chlorek 4-nitrobenzoilu, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 4 godz., t. p., rozdział RP-HPLC, 18% dla (1*S*,3*R*)-**177**, 14% dla (1*S*,3*S*)-**177**.

3.4.3. Synteza kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych **24**

Wszystkie związki, które mają udokumentowaną aktywność wobec metabotropowych receptorów glutaminergicznych to odpowiednie wolne kwasy karboksylowe lub/i fosfonowe (rysunek 19, tabela 8, str. 53). Dlatego też w celu zbadania aktywności zaprojektowanych difosfonianów należało przekształcić *O*-podstawione pochodne **176** i **177** albo wyjściowe aminohydroksydifosfoniany **161** w wolne kwasy difosfonowe **24**. Prace rozpoczęłam od przeprowadzenia prób selektywnej hydrolizy *O*-ochronionych pochodnych **176** i **177** do hydroksydifosfonianu **161**. Ze względu na obecność w difosfonianie **161** grupy hydroksylowej w pozycji α nie było możliwe przeprowadzenie hydrolizy *O*-podstawionych pochodnych **176** i **177** w środowisku silnie zasadowym ponieważ w takich warunkach może odbywać się reakcja retro-Abramova.^{153,154} Standardową metodą hydrolizy estrów do odpowiednich alkoholi i kwasów jest reakcja aminolizy.¹⁵⁵ W tych warunkach możliwe powinno być uwolnienie grupy hydroksylowej bez racemizacji i reakcji ubocznych¹⁵⁶ oraz bez jednoczesnej hydrolizy estrów kwasów karboksylowych i fosfonowych.

Octany **176** poddałam reakcji z roztworem 25% amoniaku z dodatkiem etanolu. W widmie ³¹P NMR wykonanym po tygodniu obecne były tylko sygnały pochodzące od

substratu. Trwałe w warunkach amonolitycznych okazały się również 4-nitrobenzoesany, nawet po zastosowaniu etanolu nasyconego amoniakiem.

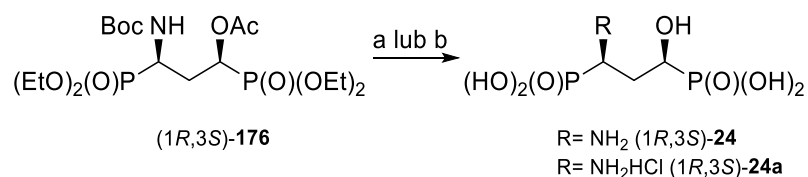
Ponieważ nie udało mi się przeprowadzić selektywnej hydrolizy *O*-acetylowych pochodnych **176** i *O*-4-nitrobenzoiowych pochodnych **177** do wyjściowego hydroksydifosfonianu **161** podjęłam próby przekształcenia ich w wolne kwasy difosfonowe **24**. W literaturze opisano hydrolizę pochodnych α -hydroksymetylofosfonianów¹⁵⁷ i α -aminometylofosfonianów¹⁴² w 5-molowym kwasie solnym w temperaturze wrzenia; w tych warunkach można również przeprowadzić usunięcie *tert*-butoksykarbonylowej grupy ochronnej.¹⁵⁸

3.4.4.1. Synteza kwasu (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowego 24 – Procedura A

Odpowiedni *O*-acetylodifosfonian (*1R,3S*)-**176**, (*1S,3R*)-**176**, (*1R,3R*)-**176** lub (*1S,3S*)-**176** ogrzewałam przez 6 godzin w 5-molowym kwasie solnym w temperaturze wrzenia. Kwasy difosfonowe (*1R,3S*)-**24**, (*1S,3R*)-**24** (*1R,3R*)-**24** lub (*1S,3S*)-**24** uzyskałam z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 53%, 86%, 84% i 69% jako bezpostaciowe białe osady neutralizując nadmiar kwasu tlenkiem propylenu (schemat 34).

3.4.4.2. Synteza kwasu (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowego 24a – Procedura B

Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność otrzymanych kwasów w wodzie, postanowiłam otrzymać je w postaci chlorowodorków. W tym celu zmodyfikowałam procedurę hydrolizy poprzez pominięcie w ostatnim etapie dodatku tlenku propylenu. Chlorowodorki (*1R,3S*)-**24a**, (*1S,3R*)-**24a**, (*1R,3R*)-**24a** oraz (*1S,3S*)-**24a** uzyskałam z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 84%, 79%, 82% oraz 84% jako bezpostaciowe białe osady (schemat 34).



Schemat 34. Synteza kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-dylo)difosfonowego **24** i chlorowodorków **24a**. Odczynniki i warunki reakcji: a. 5 M HCl, 6 godz., t. w., tlenek propylenu, 53% (1R,3S)-**24**, 86% dla (1S,3R)-**24**, 84% (1R,3R)-**24**, 69% dla (1S,3S)-**24**. b. 5 M HCl, 6 godz., t. w., 84% (1R,3S)-**24a**, 79% dla (1S,3R)-**24a**, 82% (1R,3R)-**24a**, 84% dla (1S,3S)-**24a**.

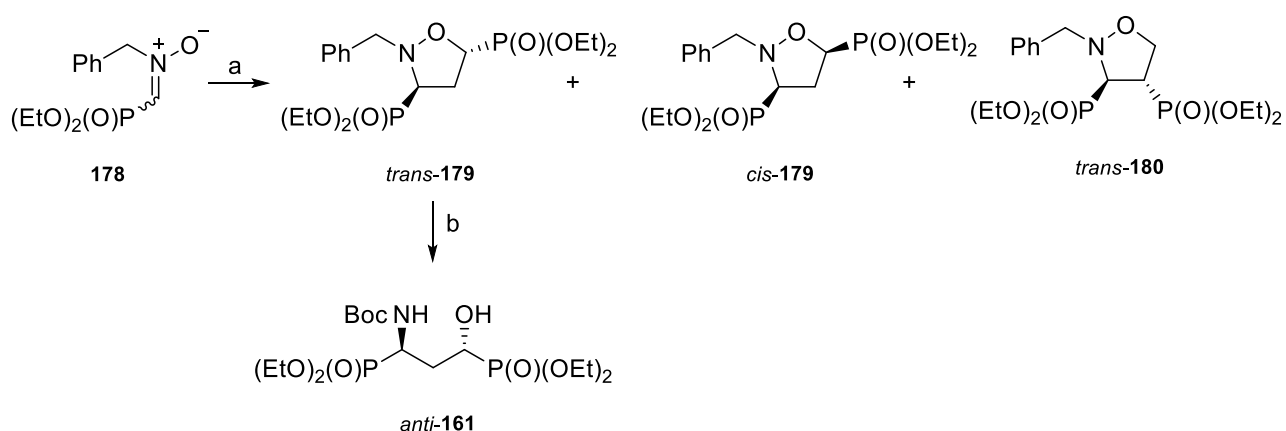
3.5. Ustalenie konfiguracji absolutnej centrum stereogenicznego na atomie C3 w (1-*tert*-butoksykarbonyloamino-3-hydroksypropano-1,3-dylo)difosfonianach tetraetylu (1R,3S)-**161**, (1R,3R)-**161**, (1S,3R)-**161** i (1S,3S)-**161**

Ponieważ do syntezy difosfonianów **161** jako substratów użyto enancjomerycznie czyste aldehydy [tj. aldehyd (*R*)-**163** do syntezy związków (1R,3S)-**161** i (1R,3R)-**161** oraz (*S*)-**163** do otrzymania związków (1S,3R)-**161** i (1S,3S)-**161**], to konfiguracja absolutną na atomie C1 w związkach **161** można zostać jednoznacznie przypisana. Natomiast w celu jednoznacznego określenia bezwzględnej konfiguracji na atomie C3, konieczne było ustalenie względnych konfiguracji między atomami C1 i C3 w odpowiednich diastereoizomerycznych parach difosfonianów, tj. w difosfonianach (1R,3S)-**161** i (1R,3R)-**161** otrzymanych z aldehydu (*R*)-**163** oraz w parze diastereoizomerów (1S,3R)-**161** i (1S,3S)-**161** powstałej z związku (*S*)-**163**.

Aby określić konfigurację względną w diastereoizomerycznych difosfonianach (1R,3S)-**161** i (1R,3R)-**161** oraz (1S,3R)-**161** i (1S,3S)-**161** postanowiłam otrzymać racemiczne difosfoniany **161** z odpowiednich 3,5-bis(dietoksyfosforylo)izoksazolidyn **179** (schemat 35). Poznany został bowiem stereochemiczny wynik reakcji cykloaddycji *N*-podstawionego *C*-(dietoksyfosforylo)nitronu do winylofosfonianu etylu, opisano również konfiguracje względne tworzących się w reakcji odpowiednich diastereoizomerycznych 3,5-bis(dietoksyfosforylo)izoksazolidyn.¹⁵⁹

Reakcja cykloaddycji *N*-benzylo-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu **178** do winylofosfonianu dietylu prowadzi do utworzenia trzech izoksazolidyn. W surowej mieszaninie poreakcyjnej zaobserwowałam sygnały pochodzące od diastereoizomerycznych 3,5-dipodstawionych izoksazolidyn *trans*-**179** (³¹P δ [ppm] = 21,32 i 20,77) i izomeru *cis*-

179 (^{31}P δ = 20,81 i 19,49 ppm) oraz regioizomerycznej 3,4-dipodstawionej pochodnej *trans*-**180** [^{31}P δ [ppm] = 27,42 (d, J = 33,2 Hz) i 21.15 (d, J = 33,2 Hz)], które powstały w stosunku 76 : 12 : 12 (schemat 35).^{159,160} Z tej mieszaniny w wyniku oczyszczania na kolumnie chromatograficznej wydzieliłam główny diastereoizomer tj. 3,5-bis(dietoksyfosforylo)izoksazolidynę *trans*-**179** [(3*R*/5*S*)-**179**] (17%). Dodatkowe oczyszczanie wzbogaconych frakcji z wykorzystaniem półpreparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych stosując jako fazę ruchomą układ woda-izopropanol (80 : 20, *v/v*) pozwoliło na wydzielenie 3,4-dipodstawionego regioizomeru *trans*-**180** [(3*R*/5*S*)-**180**] z wydajnością 3,5%.



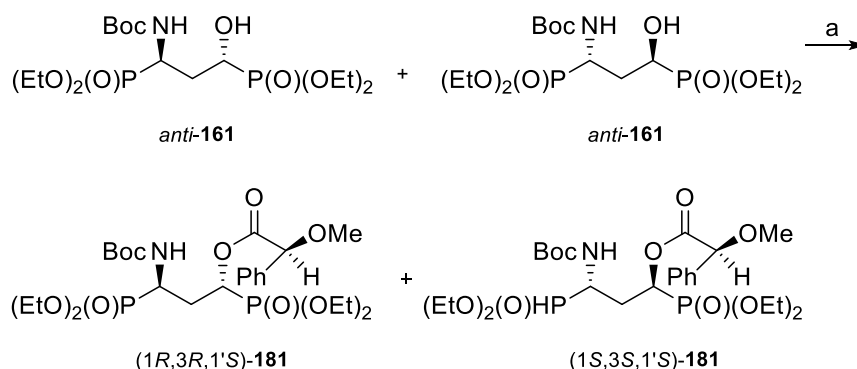
Schemat 35. Cykloaddycja nitronu **178** do winylofosfonianu dietylu. Odczynniki i warunki reakcji: a. winylofosfonian dietylu, 60°C, 48 godz., 29% dla *trans*-**179**, 3,5% dla *trans*-**180**; b. 1,01 bar, H₂, 20% Pd(OH)₂/C, EtOH, 48 godz. t. p., 74%.

W kolejnym etapie, wydzielony diastereoizomer o konfiguracji *trans*-**179** przekształciłam w związek *anti*-**161** w reakcji wodorolitycznego rozerwania wiązania N–O z jednoczesnym usunięciem grupy benzylovej w obecności Boc₂O. Transformacja związku *trans*-**179** w *anti*-**161** przebiega bez zmian konfiguracji centrów stereogenicznych, a więc względną konfigurację określającą relacje pomiędzy podstawnikami przy atomach C1 i C3 w racemicznym związku **161** można jednoznacznie określić jako *anti* [(1*R*/3*R*)-**161**] (schemat 35). Na podstawie porównania wartości przesunięć chemicznych w widmach ^{31}P NMR ustaliłam, że związek *anti*-**161** [(1*R*/3*R*)-**161**] (2 dublety przy δ [ppm]= 24,60 (d, $^4J_{\text{PCCCP}}=8,0$ Hz) i 24,01 (d, $^4J_{\text{PCCCP}}=8,0$ Hz)) ma taką samą konfigurację względną jak enancjomeryczne pary difosfonianów (1*R*,3*R*)-**161** i (1*S*,3*S*)-**161** (schemat 29, str. 62).

W reakcji Abramova, w wyniku addycji fosforynu dietylowego do aldehydu (*R*)-**163** lub (*S*)-**163** powstaje odpowiedni addukt *syn* oraz izomeryczny produkt *anti*-**161**. W konsekwencji drugiej parze enancjomerów, tj. związkowi (*1R,3S*)-**161** otrzymanemu z aldehydu (*R*)-**163** oraz difosfonianowi (*1S,3R*)-**161** powstałemu z aldehydu (*S*)-**163** przypisałam konfigurację względną *syn* (schemat 29, str. 62).

Ponieważ konfiguracja centrum stereogenicznego przy C1 w odpowiednich difosfonianach **161** jest znana, określenie konfiguracji względnej w parach diastereoizomerów otrzymanych z aldehydów (*R*)-**163** lub (*S*)-**163** jednoznacznie umożliwiło przypisanie konfiguracji centrum stereogenicznego C3 w enancjomerycznych związkach **161**.

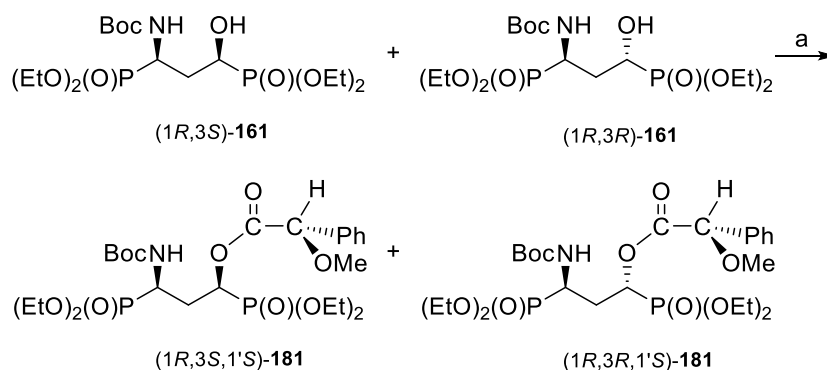
W celu uzyskania dodatkowego dowodu potwierdzającego absolutną konfigurację na atomie C3 w odpowiednich 3-hydroksypropylodifosfonianach **161**, racemiczny związek *anti*-**161** [(*1R/S,3R/S*)-**161**] otrzymany z izoksazolidyny *trans*-**179** przekształciłam w diastereoizomeryczną mieszaninę pochodnych *O*-metylomigdałowych (*1R,3R,1'S*)-**181** (^{31}P δ [ppm] = 24,34 i 18,42) i (*1S,3S,1'S*)-**181** (δ ^{31}P [ppm] = 23,98 i 19,32) poprzez estryfikację kwasem (*S*)-*O*-metylomigdałowym¹⁶¹ w obecności DCC¹⁶² (schemat 36). Mimo że rozdzielenie diastereoizomerycznych *O*-metylomigdałanów było utrudnione nawet przy wykorzystaniu techniki HPLC, głównie ze względu na problemy z usuwaniem dicykloheksylomocznika (DCU), uzyskałam wystarczającą ilość diastereoizomerów do rejestracji widm ^1H i ^{31}P NMR. Za pomocą RP-HPLC wydzieliłam związki (*1R,3R,1'S*)-**181** $t_{\text{R}} = 15,77$ oraz (*1S,3S,1'S*)-**181** $t_{\text{R}} = 17,86$ w układzie woda-acetonitryl (63 : 37, v/v) (schemat 36). Niestety *O*-metylomigdałany **181** okazały się nietrwałe nawet w temperaturze -4°C .



Schemat 36. Synteza [1-*tert*-butoksykarbonyloamino-3-(2-fenyl-2-metoksyacetoksy)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (*1R,3R,1'S*)-**181** i (*1S,3S,1'S*)-**181**. Odczynniki i warunki reakcji: a. kwas (*S*)-*O*-metylomigdałowy, DCC, DMAP,

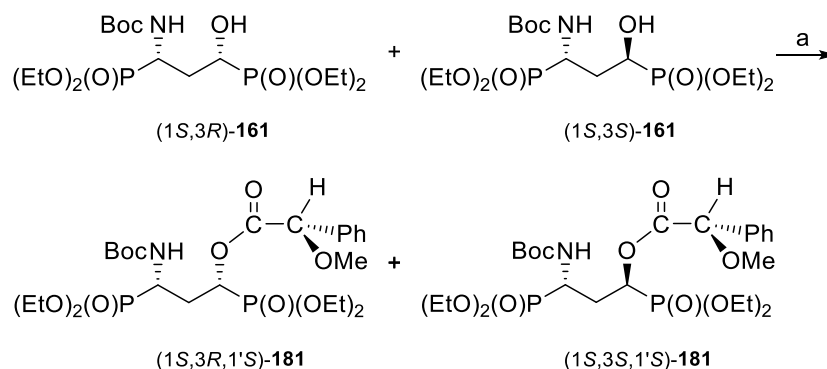
CH₂Cl₂, 24 godz., t. p., rozdział RP-HPLC, 14% dla (1*R*,3*R*,1'*S*)-**181**, 10% dla (1*S*,3*S*,1'*S*)-**181**.

W celu otrzymania wszystkich stereoizomerów (*S*)-*O*-metylomigdałowych pochodnych 3-hydroksydifosfonianów **181**, przeprowadziłam analogiczne reakcje wychodząc z odpowiednich mieszanin diastereoizomerycznych fosfonianów **161** otrzymanych bezpośrednio z enancjomerycznie czystych aldehydów **163** (schemat 29, str. 62). W ten sam sposób mieszaninę 3-hydroksydifosfonianów (1*R*,3*S*)-**161** i (1*R*,3*R*)-**161** otrzymaną z aldehydu (*R*)-**163** przekształciłam w (*S*)-*O*-metylomigdałany (1*R*,3*R*,1'*S*)-**181** (*t_R* = 12,56) i (1*R*,3*S*,1'*S*)-**181** (*t_R* = 14,12), które wstępnie oczyściłam na żelu krzemionkowym, a następnie rozdzieliłam za pomocą HPLC w układzie woda-acetonitryl (61,5 : 38,5, *v/v*) (schemat 37).



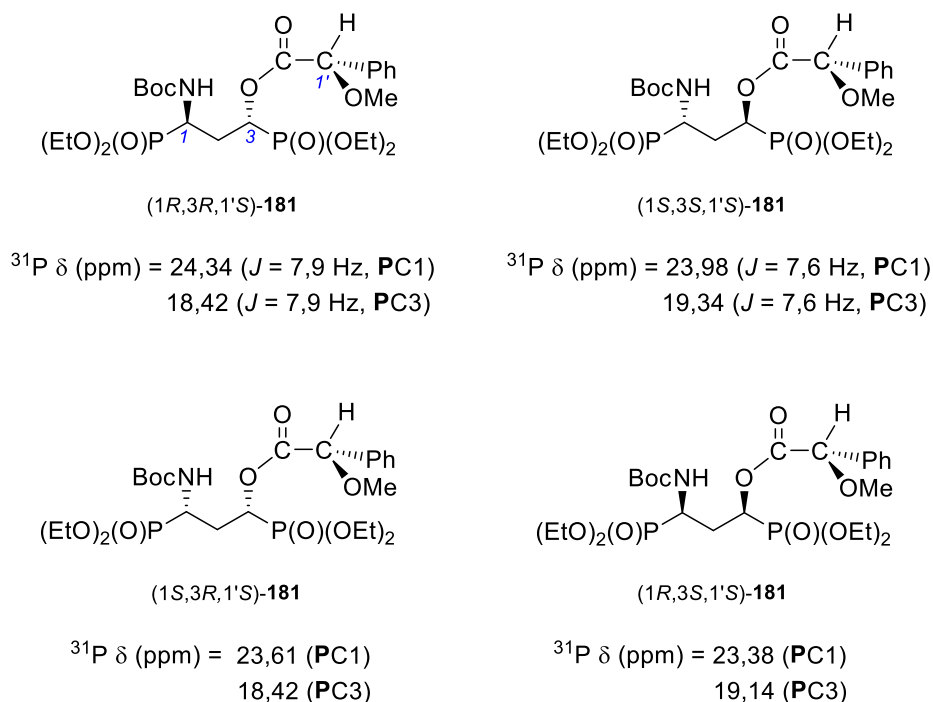
Schemat 37. Synteza [1-*tert*-butoksykarbonyloamino-3-(2-fenyl-2-metoksyacetoksy)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*R*,3*R*,1'*S*)-**181** i (1*R*,3*S*,1'*S*)-**181**. Odczynniki i warunki reakcji: a. kwas (*S*)-*O*-metylomigdałowy, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 24 godz., t. p., rozdział RP-HPLC, 3% dla (1*R*,3*R*,1'*S*)-**181**, 8% dla (1*R*,3*S*,1'*S*)-**181**.

Natomiast estry (1*S*,3*R*,1'*S*)-**181** (*t_R* = 9,06) i (1*S*,3*S*,1'*S*)-**181** (*t_R* = 10,82) zsyntezowałam z 3-hydroksydifosfonianów (1*S*,3*R*)-**161** i (1*S*,3*S*)-**161** otrzymanych z aldehydu (*S*)-**163** (schemat 38). Mieszaninę związków (1*S*,3*R*,1'*S*)-**181** i (1*S*,3*S*,1'*S*)-**181**, po wstępnym oczyszczeniu na żelu krzemionkowym, rozdzieliłam za pomocą HPLC w układzie woda-acetonitryl (60 : 40, *v/v*).



Schemat 38. Synteza [1-*tert*-butoksykarbonyloamino-3-(2-fenylo-2-metoksyacetoksy)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (*1S,3R,1'S*)-**181** (*1S,3S,1'S*)-**181**. Odczynniki i warunki reakcji: a. kwas (*S*)-*O*-metylomigdałowy, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 24 godz., t. p., rozdział RP-HPLC, 30% dla (*1S,3R,1'S*)-**181**, 26% dla (*1S,3S,1'S*)-**181**.

Spilling wraz ze współpracownikami prowadził intensywne badania nad ustalaniem konfiguracji absolutnej α -hydroksyfosfonianów.⁵⁰ Zaobserwował, że przesunięcia chemiczne w widmach ³¹P NMR estrów kwasu (*R*)-*O*-metylomigdałowego i (*S*)- α -hydroksyfosfonianów występują w wyższym polu w porównaniu z sygnałami pochodzącymi od analogicznych estrów kwasu (*R*)-*O*-metylomigdałowego i (*R*)- α -hydroksyfosfonianów.¹⁶³ Należy zatem oczekiwać, że w widmie ³¹P NMR przesunięcia chemiczne odpowiednich estrów kwasu (*S*)-*O*-metylomigdałowego i (*R*)- α -hydroksyfosfonianów będą występowały w wyższym polu w porównaniu z estrami kwasu (*S*)-*O*-metylomigdałowego i (*S*)- α -hydroksyfosfonianów.¹⁵⁰ Ta ogólna zasada znalazła także zastosowanie w przypadku 3-hydroksydifosfonianów **161** (rysunek 21). Sygnał pochodzący od atomu fosforu znajdującego się bezpośrednio przy atomie węgla C3 w pochodnej (*1R,3R,1'S*)-**181** występował w wyższym polu (δ ³¹P = 18,42 ppm) w porównaniu z odpowiednim sygnałem diastereoizomeru (*1S,3S,1'S*)-**181** (δ ³¹P = 19,34 ppm). Podobnie w przypadku drugiej pary diastereoizomerów, niższą wartość przesunięcia chemicznego dla fosforu przy atomie węgla C3 obserwovałam w przypadku *O*-metylomigdałanu (*1S,3R,1'S*)-**181** (δ ³¹P = 18,42 ppm) w porównaniu z diastereoizomerem (*1R,3S,1'S*)-**181** (δ ³¹P = 19,14 ppm). Tym samym porównując przesunięcia chemiczne w widmach ³¹P NMR odpowiednich par diastereoizomerów (*1R,3R,1'S*)-**181** i (*1S,3S,1'S*)-**181** oraz (*1S,3R,1'S*)-**181** i (*1R,3S,1'S*)-**181** jednoznacznie potwierdziłam ustaloną wcześniej konfigurację absolutną izomerycznych 1-amino-3-hydroksydifosfonianów **161**.

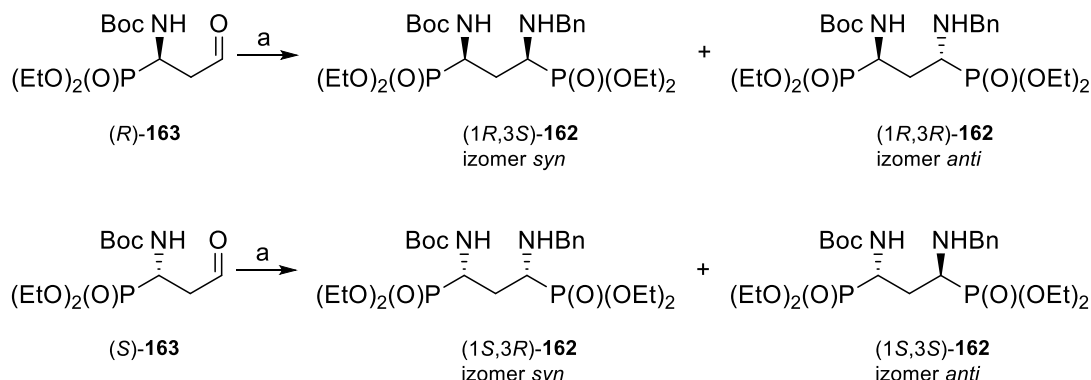
Rysunek 21. Struktury disatereoizomerycznych *O*-metylomigdałów **181**.

3.6. Synteza kwasów (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowych *mezo*-**25**, (1R,3R)-**25**, (1S,3S)-**25**

3.6.1. Synteza (3-benzyloamino-1-*tert*-butoksykarbonyloaminopropano-1,3-diylo)difosfonianu tetraetylu poprzez reakcję Kabachnika Fieldsa – procedura A

W celu otrzymania podstawionych pochodnych diaminodifosfonianów (1R,3S)-**162** i (1R,3R)-**162**, aldehyd (*R*)-**163** poddałam reakcji Kabachnika-Fieldsa z benzyloaminą i fosforem trietylowym w trifluoroetanolu. W widmie ^{31}P NMR surowej mieszaniny poreakcyjnej zaobserwowałam 4 sygnały, które przypisałam odpowiednio dwóm produktom: związkowi (1R,3R)-**162** (izomer *anti*) 2 singlety (δ [ppm]= 27,11 i 24,53) oraz difosfonianowi (1R,3S)-**162** (izomer *syn*) 2 dublety (δ [ppm] = 27,83 $J = 8,5$ Hz i 25,21 $J = 8,5$ Hz). Na podstawie integracji sygnałów ustaliłam, że diastereoizomery powstały w stosunku 24:76 (*anti* : *syn*). W wyniku oczyszczania za pomocą grawitacyjnej chromatografii kolumnowej w układzie chloroform-metanol (100 : 1, v/v), udało mi się uzyskać jedynie frakcje wzbogacone w powstający w przewodzie diastereoizomer (1R,3S)-**162** (do 95%). Opracowałam jednak warunki efektywnego rozdzielania wykorzystując półpreparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych stosując jako fazę ruchomą układ woda-acetonitryl (55 : 45 v/v) z elucją izokratyczną

i wydzieliłam związki (1*R*,3*R*)-**162** ($t_R = 5,20$) oraz (1*R*,3*S*)-**162** ($t_R = 6,92$) z wydajnościami odpowiednio 17% oraz 53% (schemat 39).



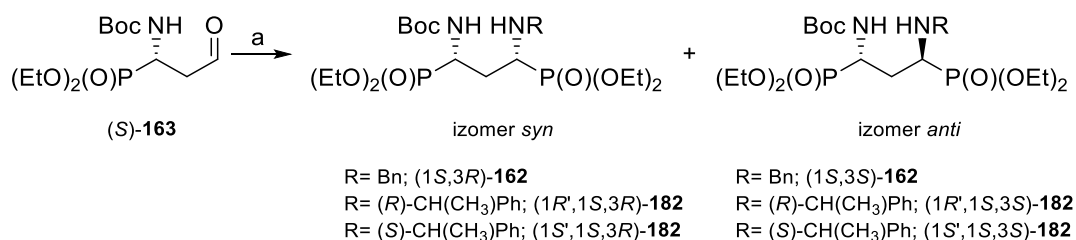
Schemat 39. Synteza (3-benzyloamino-1-*tert*-butoksykarbonyloaminopropano-1,3-diylo)difosfonianu tetraetylu **162** poprzez reakcję Kabachnika-Fieldsa. Odczynniki i warunki reakcji: a. benzyloamina, fosforyn trietylowy, TFE, 24 godz., t. p., 17% dla (1*R*,3*R*)-**162**, 53% dla (1*R*,3*S*)-**162**, 16% dla (1*S*,3*S*)-**162**, 41% dla (1*S*,3*R*)-**162**.

Difosfoniany (1*S*,3*R*)-**162** i (1*S*,3*S*)-**162** otrzymałam w analogicznej reakcji wykorzystując jako substrat aldehyd o konfiguracji (*S*)-**163**. Oba diastereoizomery, po wstępnym oczyszczeniu na żelu krzemionkowym, wydzieliłam za pomocą półpreparatywnej wysokosprawnej chromatografii ciekową w układzie faz odwróconych stosując elucję izokratyczną. Przy zastosowaniu układu ze zwiększoną ilością wody, woda-acetonitril (59 : 41, v/v), otrzymałam związki (1*S*,3*S*)-**162** ($t_R = 7,53$) oraz (1*S*,3*R*)-**162** ($t_R = 10,21$) z wydajnościami odpowiednio 16% oraz 41%.

3.6.2. Synteza [3-benzyloamino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianu tetraetylu poprzez reakcję aza-Pudovika – procedura B

W warunkach reakcji Kabachnika-Fieldsa z aldehydem (*S*)-**163** powstały diastereoizomery (1*S*,3*R*)-**162** (izomer *anti*) oraz (1*S*,3*S*)-**162** (izomer *syn*) (schemat 40). Postanowiłam zbadać wpływ dodatkowego centrum stereogenicznego w aminie na diastereoselektywność badanej reakcji Kabachnika-Fieldsa stosując w miejsce benzyloaminy enancjomeryczne 1-fenyletyloaminy (*S*)-**165** oraz (*R*)-**165** (schemat 40). Aminy (*S*)-**165** oraz (*R*)-**165** poddałam reakcjom z aldehydem (*S*)-**163**, uzyskując mieszaniny diastereoizomerów **182**, których proporcje zostały ustalone na podstawie analizy widm ^{31}P NMR surowych mieszanin poreakcyjnych (tabela 9). Oprócz sygnałów od związków **182**, zaobserwowałam także charakterystyczne sygnały pochodzące od jednego z produktów reakcji Abramova (1*S*,3*S*)-**161** (2 dublety przy 24,55 i 24,06 ppm)

przedstawionego na schemacie 29 (str. 62). W celu potwierdzenia, że niezależnie od zastosowanej aminy powstaje w przewodzie izomer *anti*, mieszaniny związków (1*S*,3*R*)-**162** i (1*S*,3*S*)-**162** oraz (1*S'*,1*S*,3*R*)-**182** i (1*S'*,1*S*,3*S*)-**182** poddałam reakcjom wodorolitycznego usunięcia grup ochronnych, odpowiednio benzylowej i 1-feniloetylowej z jednoczesnym wprowadzeniem funkcji *tert*-butoksykarbonylowej (schemat 41, str. 75). W widmach ^{31}P NMR surowych mieszanin w obu przypadkach obserwowałam po 1 sygnale od każdego z oczekiwanych *N,N*-diBoc-diaminofosfonianów: δ [ppm] = 24,38 dla związku (1*S*,3*S*)-**183** oraz przy δ [ppm] = 25,04 pochodzący od związku *mezo*-**183**, który w obu przypadkach stanowił główny produkt. Postanowiłam poszukać innych warunków reakcji w celu zmiany stosunku tworzących się diastereoizomerów.

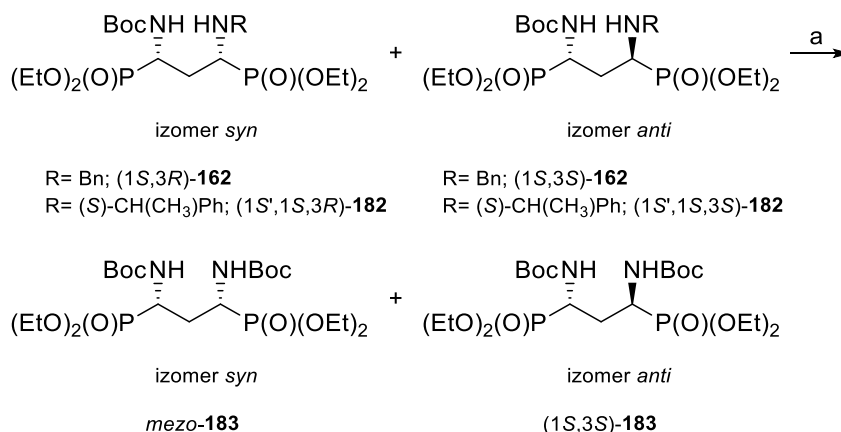


Schemat 40. Synteza (3-benzyloamino- i (*S*)-(1-feniloetylo) 1-*tert*-butoksykarbonyloaminopropano-1,3-diylodifosfonianów tetraetylu **162** i **182** poprzez reakcję Kabachnika-Fieldsa. Odczynniki i warunki reakcji: a. odpowiednia amina, fosforzyn trietylowy, TFE, 24 godz., t. p.

Tabela 9. Porównanie diastereoselektywności reakcji Kabachnika-Fieldsa z wykorzystaniem różnych amin.

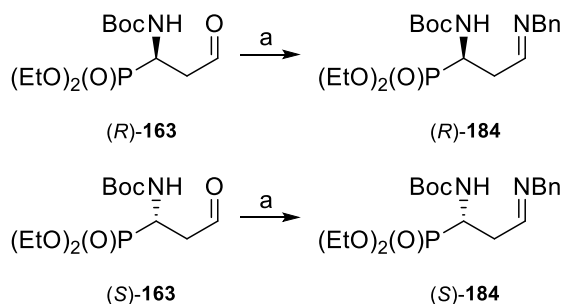
Amina	Produkty reakcji	Proporcje diastereoizomerów <i>anti:syn</i> ^a
NH ₂ Bn	(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)- 162 : (1 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)- 162	24 : 76
(<i>R</i>)- 165	(1 <i>R'</i> ,1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)- 182 : (1 <i>R'</i> ,1 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)- 182	12 : 88*
(<i>S</i>)- 165	(1 <i>S'</i> ,1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)- 182 : (1 <i>S'</i> ,1 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)- 182	28 : 72*

^a stosunek diastereoizomerów ustalony za pomocą ^{31}P NMR; *powstawał produkt reakcji Abramova (1*S*,3*S*)-**161**.



Schemat 41. Wodorolityczne usunięcie grup benzylowej i (*S*)-fenyloetylowej. Odczynniki i warunki reakcji: a. H₂, 1,01 bar, Pd(OH)₂/C, Boc₂O, EtOH, t. p., 14 godz.

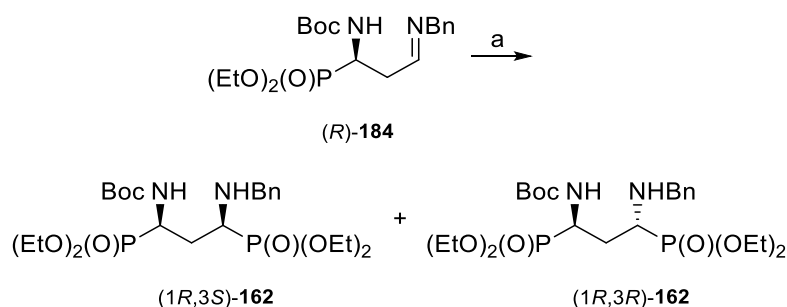
W literaturze opisano szereg diastereo- i enancjoselektywnych syntez aminofosfonianów.^{164,165} Jedną z metod otrzymywania aminometylofosfonianów, którą wykorzystywałam już wcześniej do syntezy nitronu (*S*)-**166** jest reakcja aza-Pudovika. W tym celu w pierwszej kolejności należało otrzymać iminę **184**, którą zsyntezowałam w standardowych warunkach.¹⁶⁶ W surowym widmie ³¹P NMR zaobserwowałam pojedynczy sygnał przy δ = 23,83 ppm, a w widmie ¹H NMR multiplet pochodzący od protonów pierścienia aromatycznego δ = 7,35 – 7,29 oraz singlet pochodzący od protonów grupy benzylowej przy 4,57 ppm, potwierdzając tym samym utworzenie oczekiwanej iminy **184** (schemat 42).



Schemat 42. Synteza [(3-(benzylimino)-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propylo]fosfonianów dietylu (*R*)-**184** (*S*)-**184**. Odczynniki i warunki reakcji: a. benzyloamina, MgSO₄, CH₂Cl₂, 24 godz., 82% dla (*R*)-**183**, 83% dla (*S*)-**183**.

Kolejnym etapem było poddanie iminy reakcji aza-Pudovika. Podczas optymalizacji warunków reakcji zmieniałam następujące parametry: temperaturę, rozpuszczalnik katalizator oraz rodzaj fosforynu (fosforyn dietylowy lub trietylowy). Ostatecznie

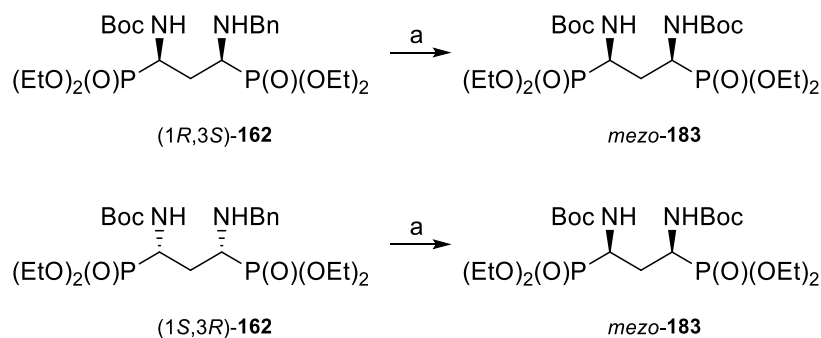
zastosowałam procedurę opracowaną przez Metlushka i współpracowników. Dodatek nadmiaru kwasu trifluorooctowego do mieszaniny reakcyjnej powodował całkowite uprotonowanie iminy, dzięki czemu następowała aktywacja wiązanie C=N na atak nukleofilowy.^{167,168} Dodatkowo, w tej metodzie zastosowano nadmiar fosforu trietylowego ze względu na tworzenie się fosforu dietylowego podczas reakcji.^{167,169} Reakcję iminy (*S*)-**184** z fosforem trietylowym prowadziłam przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Analiza widma ³¹P NMR surowej mieszaniny poreakcyjnej wykazała całkowite przereagowanie iminy oraz brak sygnałów pochodzących od produktów ubocznych. W zastosowanych warunkach powstała mieszanina diastereoizomerów *anti* : *syn* w stosunku 55 : 45. Reakcja powtórzona w większej skali w celu wydzielenia diastereoizomerów, przebiegła z nieco inną diastereoselektywnością niż w małej skali (*anti* : *syn* w stosunku 30 : 70). Diastereoizomery wydzieliłam z podobnymi wydajnościami jak w przypadku trójskładnikowej reakcji Kabachnika-Fieldsa (schemat 39, str. 73).



Schemat 43. Synteza (3-benzyloamino-1-*tert*-butoksykarbonyloaminopropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu (*1R,3S*)-**162** i (*1R,3R*)-**162** poprzez reakcję aza-Pudovika. Odczynniki i warunki reakcji: a. (EtO)₃P, TFA, toluen, 24 godz., 22% dla (*1R,3R*)-**162**, 56% dla (*1R,3S*)-**162**.

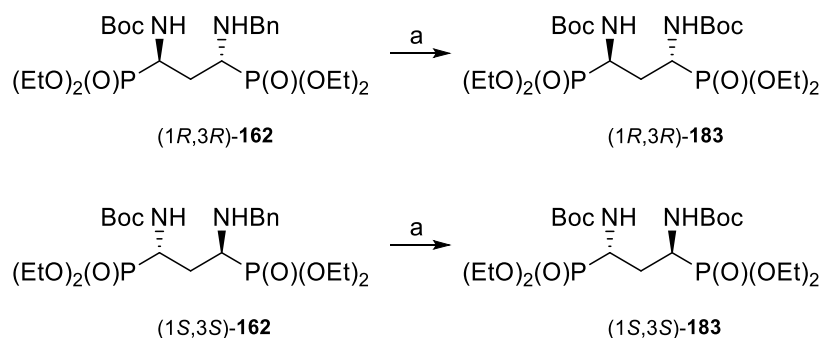
3.6.3. Synteza [(1,3-bis-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu **183**

W celu otrzymania kwasów 1,3-diaminodifosfonowych **25** należało usunąć grupy benzylove w pochodnych **162**, a uzyskane związki **183** zhydrolizować za pomocą kwasu solnego (schematy 44-46, str. 77-78). Wodorolityczne usunięcie grup benzylowych w związkach (*1R,3S*)-**162** i (*1S,3R*)-**162** przeprowadziłam w reaktorze pod ciśnieniem 12 barów w temperaturze pokojowej. Otrzymałam związek *mezo*-**183** z (*1R,3S*)-**162** i (*1S,3R*)-**162** z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 77% i 79% w postaci białego osadu (schemat 44).



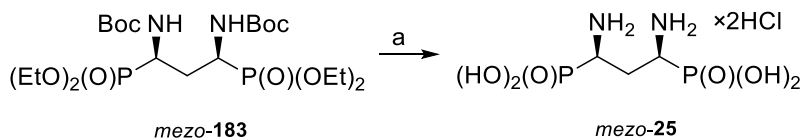
Schemat 44. Synteza [(1,3-bis-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu *meso*-**183**. Odczynniki i warunki reakcji: H₂, Pd(OH)₂/C, 12 bar, Boc₂O, EtOH, godz., t. p., 8 godz., 77% z (1*R*,3*S*)-**162**, 79% z (1*S*,3*R*)-**162**.

Reakcje wodorolizy izomerów (1*R*,3*R*)-**162** i (1*S*,3*S*)-**162** przeprowadziłam pod ciśnieniem atmosferycznym (zbyt mała skala eksperymentu aby przeprowadzić go w reaktorze ciśnieniowym). Pochodne (1*R*,3*R*)-**183** i (1*S*,3*S*)-**183** otrzymałam z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 57% i 50% jako bezbarwne oleje (schemat 45).



Schemat 45. Synteza [(1,3-bis-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu (1*R*,3*R*)-**183** i (1*S*,3*S*)-**183**. Odczynniki i warunki reakcji: H₂, 1,01 bar, Pd(OH)₂/C, Boc₂O, EtOH, t. p., 14 godz., 57% dla (1*R*,3*R*)-**183**, 50% dla (1*S*,3*S*)-**183**.

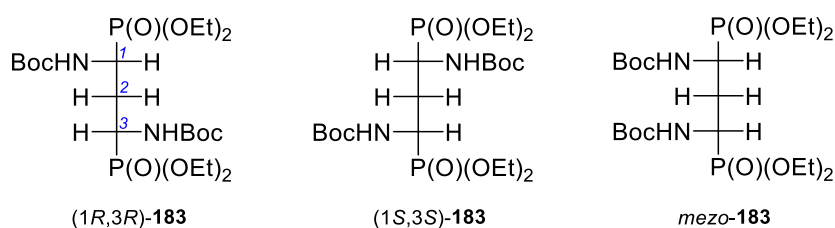
W celu przekształcenia difosfonianów **183** w wolne kwasy fosfonowe **25** zastosowałam warunki analogiczne jak podczas hydrolizy pochodnych 1-amino-3-hydroksydifosfonianów **161**, które wydzielałam jako odpowiednie sole. Związki **25** otrzymałam w postaci białych osadów z wydajnościami odpowiednio 93% dla *meso*-**25**, 73% dla (1*R*,3*R*)-**25** oraz 80% dla (1*S*,3*S*)-**25** (schemat 46). Na podstawie wyników analizy elementarnej otrzymanych związków ustaliłam, że pochodne **25** występują w postaci dichlorowodorków.



Schemat 46. Synteza kwasów (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowych *mezo-25*, (1*R*,3*R*)-**25** i (1*S*,3*S*)-**25** w postaci dichlorowodoroków. Odczynniki i warunki reakcji: 5M HCl, 6 godz., t. w., 93% dla *mezo-25*, 73% (1*R*,3*R*)-**25**, 80% dla (1*S*,3*S*)-**25**.

3.7. Ustalenie konfiguracji absolutnej na atomie C3 w estrach kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych (1*R*,3*R*)-**162**, (1*R*,3*S*)-**162**, (1*S*,3*S*)-**162** i (1*S*,3*R*)-**162**

W celu określenia konfiguracji absolutnej centrum stereogenicznego na C3 w produktach reakcji Kabachnika-Fieldsa (1*R*,3*R*)-**162** i (1*R*,3*S*)-**162** oraz (1*S*,3*S*)-**162** i (1*S*,3*R*)-**162**, postanowiłam przekształcić je w warunkach wodorolitycznych w pochodne [1,3-bis-(*N*-Boc-amino)prop-1,3-diylo]difosfoniany **183** przedstawione na rysunku 22. W wyniku takiego przekształcenia oczekiwać należy powstania enancjomerycznych produktów **183** z odpowiednich fosfonianów o konfiguracji względnej *anti*-**162**, natomiast analogiczna reakcja fosfonianów *syn*-**162** prowadzić będzie do powstania związku *mezo*-**183**. Na tej podstawie można ustalić względne ułożenie grup aminowych przy atomach C1 i C3. Ponieważ w reakcji Kabachnika-Fieldsa użyto enancjomerycznie czystych aldehydów, zaś w reakcji aza-Pudowika odpowiednich imin z nich otrzymanych, to konfiguracja absolutna na atomie C1 w odpowiednich produktach reakcji jest znana. Ustalenia konfiguracji na atomie C3 wymaga zatem poznania względnej relacji pomiędzy podstawnikami przy atomach C1 i C3.



Rysunek 22. Struktury związków (1*R*,3*R*)-**183**, (1*S*,3*S*)-**183** i *mezo*-**183** w projekcji Fischera.

Względne relacje między podstawnikami C1 i C3 w związkach (1*R*,3*R*)-**183** i *mezo*-**183** ustaliłam analizując ich widma ^1H NMR. Diagnostyczne okazały się sygnały

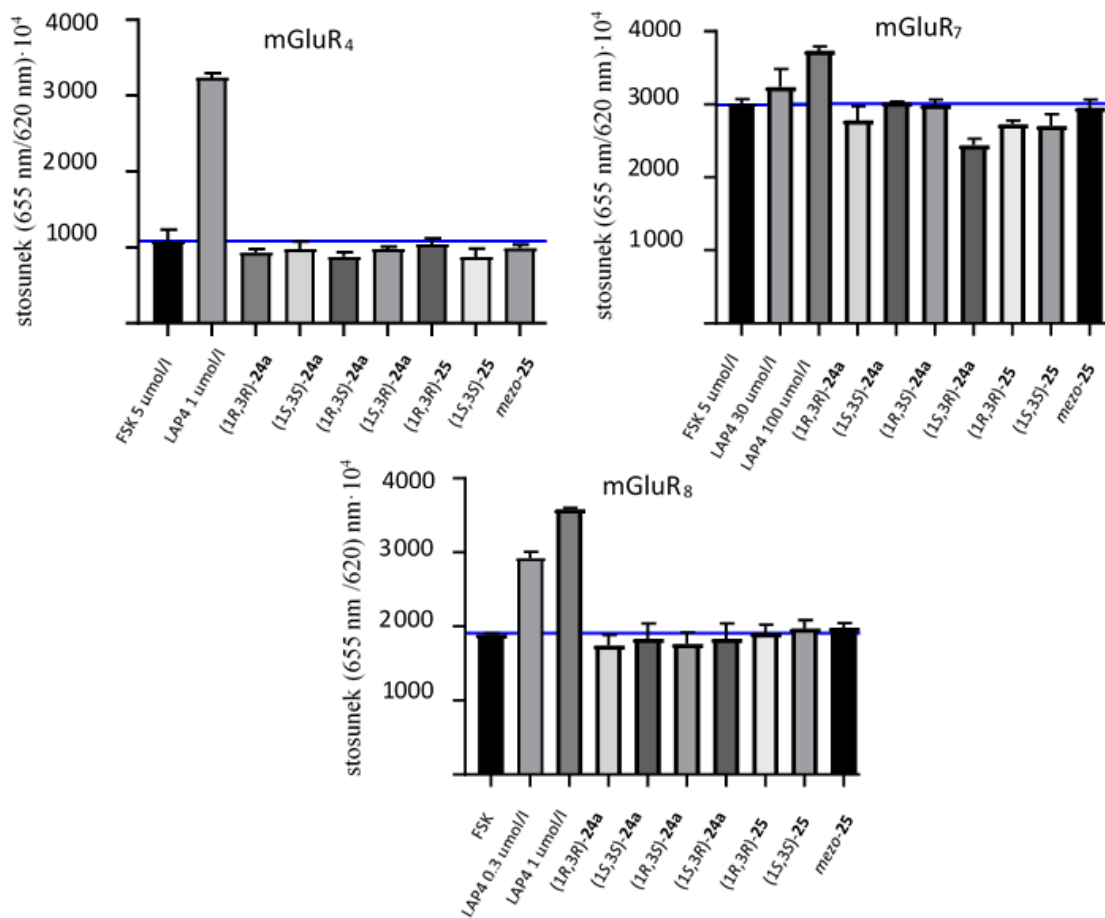
pochodzące od protonów przy C2. Dla pochodnej (1*R*,3*R*)-**183** zaobserwowałam dwa multiplety pochodzące od dwóch protonów przy atomie węgla C2 w zakresie $\delta = 2,51 - 2,29$ ppm oraz 1,93 – 1,77 ppm. Natomiast dla związku *mezo*-**183** zaobserwowałam jeden dublet kwartetów przy 2,05 ppm o integracji odpowiadającej dwóm protonom, co potwierdza, że jest to związek *mezo*.

Otrzymane wartości skręcalności właściwej potwierdziły relacje enacjomeryczne pomiędzy związkami: (1*R*,3*R*)-**183** $[[\alpha]_D^{20} = -6,28$ (*c* 1,05, CHCl₃)] i (1*S*,3*S*)-**183** $[[\alpha]_D^{20} = +6,18$ (*c* 1,10, CHCl₃)]. Izomer *mezo*-**183** nie skręcał światła spolaryzowanego płaszczyzny.

3.8. Ocena aktywności biologicznej

Kwasy difosfonowe (1*R*,3*R*)-**24a**, (1*R*,3*S*)-**24a**, (1*S*,3*S*)-**24a**, (1*S*,3*R*)-**24a**, (1*R*,3*R*)-**25**, (1*S*,3*S*)-**25** oraz *mezo*-**25** zostały poddane ocenie w kierunku aktywności agonistycznej wobec metabotropowych receptorów glutaminergicznych III grupy: mGluR₅, mGluR₇ i mGluR₈. Badania zostały przeprowadzone we współpracy z Panem dr. Piotrem Brańskim w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Do ekspresji białek wykorzystano linię komórkową HEK293 Tet-on z ekspresją receptorów metabotropowych: mGluR₅, mGluR₇ i mGluR₈ stymulowaną za pomocą tetracykliny. Związkiem referencyjnym użytym do porównania aktywności agonistycznej badanych kwasów difosfonowych był LAP4 (kwas L-4-fosfeno-2-aminobutanowy). Receptory metabotropowe III grupy hamują aktywność cykazy adenylowej tym samym zmniejszając poziom cAMP. W celu zbadania poziomu aktywności receptorów należało sztucznie stymulować receptor poprzez dodatek forskoliny (FSK), który powoduje akumulację cAMP w liniach komórkowych. Pomiar sygnału przedstawiono na wykresach jako stosunek długości fal 655 nm do 620 nm (rysunek 23). Przedstawione sygnały były odwrotnie proporcjonalne do stężenia cAMP w próbkach.



Rysunek 23. Aktywność związków **24a** i **25** wobec receptorów mGluR względem związku referencyjnego LAP4 w stężeniach badanych związków 10 μmol/l dla mGluR₄ i mGluR₈ oraz 100 μmol/l dla mGluR₇.

Niestety przebadane związki nie wykazywały oczekiwanej aktywności agonistycznej.

4. PODSUMOWANIE

4. PODSUMOWANIE

Celem mojej pracy była synteza enancjomerycznie czystych kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych **24** oraz (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowych **25** jako analogów kwasu glutaminowego. Założyłam, że wprowadzenie dodatkowego podstawnika przy C3 (grupa hydroksylowa albo aminowa) oraz obecność reszt fosfonowych $[P(O)(OH)_2]$ w miejscu funkcji karboksylowych $[COOH]$ skutkować będzie silniejszym oddziaływaniem zaprojektowanych związków w miejscu aktywnym receptora. Ponieważ stereoizomery różniące się konfiguracją absolutną mogą wykazywać inną aktywność biologiczną, otrzymałam wszystkie możliwe stereoizomery, cztery dla związku **24a** i trzy dla związku **25**.

Prekursorem w syntezie enancjomerycznych kwasów difosfonowych były enancjomerycznie czyste 1-(*N*-Boc-amino)-3-oksopropylfosfoniany dietylu (*R*)-**163** i (*S*)-**163**, które w reakcji Abramova z fosforynem dietylowym zostały przekształcone w izomeryczne (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfoniany tetraetylu **161**, zaś w reakcji Kabachnika-Fieldsa z fosforynem trietylowym i benzyloaminą utworzyły (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfoniany tetraetylu **163**.

Enancjomerycznie czyste 1-(*N*-Boc-amino)-3-oksopropylfosfoniany dietylu (*R*)-**163** i (*S*)-**163** otrzymałam z (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-**164** modyfikując procedurę opracowaną wcześniej w zespole. Opracowałam również alternatywną ścieżkę syntezy (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-**164**, która okazała się szybsza i wydajniejsza.

Opracowałam warunki efektywnego rozdzielania diastereoizomerycznych izoksazolidyn **173**, produktów pośrednich w syntezie aldehydów (*R*)-**163** i (*S*)-**163**, wykorzystując technikę RP-HPLC. Pozwoliło to na pominięcie dwóch etapów reakcji, a także na wykorzystanie rozpuszczalników bardziej przyjaznych środowisku.

Diastereoizomeryczne mieszaniny związków **161** przekształciłam w pochodne *O*-acetylowe **176** oraz *O*-4-nitrobenzoesowe w celu poprawy skuteczności rozdzielania ich za pomocą RP-HPLC. Podobnie, diastereoizomeryczne mieszaniny (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu **163** wydzieliłam z dobrymi wydajnościami wykorzystując półpreparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych.

Diastereoizomeryczne *O*-acetylowe pochodne **176** zhydrolizowałam do odpowiednich kwasów difosfonowych. W celu otrzymania kwasów 1,3-diaminodifosfonowych **25**, przeprowadziłam wodorolityczne usunięcie grup benzytowych w pochodnych **162**, a uzyskane związki **183** poddałam hydrolizie kwasowej. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność wolnych kwasów difosfonowych **24**, zmodyfikowałam procedurę hydrolizy i wydzieliłam je, w postaci lepiej rozpuszczalnych w wodzie chlorowodorków **24a** oraz **25**.

Ustaliłam konfiguracje absolutne odpowiednich (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu **161** w oparciu o regułę Spillinga analizując widm ^{31}P NMR ich odpowiednich estrów kwasu (*S*)-*O*-metylomigdałowego **181** oraz na niezależnej drodze przekształcając *N*-benzylo-3,5-bis(dietoksyfosfonylo)izoksazolidynę **179** o znanej konfiguracji względnej *trans* w odpowiedni difosfonian *anti*-**161** [(1*R*/*S*,3*R*/*S*)-**161**].

Konfiguracje absolutne produktów reakcji Kabachnika-Fieldsa **162** ustaliłam przekształcając je w warunkach wodorolitycznych w pochodne [1,3-bis-(*N*-Boc-amino)prop-1,3-diylo]difosfonianowe **183**. W wyniku takiego przekształcenia z odpowiednich difosfonianów o konfiguracji względnej *anti*-**162** powstały enancjomeryczne produkty (1*R*,3*R*)-**183** i (1*S*,3*S*)-**183**, natomiast w analogicznej reakcji difosfonianów *syn*-**162** otrzymałam izomer *mezo*-**183**. Oznaczone wartości skręcalności właściwej potwierdziły relacje enancjomeryczne pomiędzy związkami (1*R*,3*R*)-**183** i (1*S*,3*S*)-**183**.

We współpracy z Panem dr. Piotrem Brańskim dokonano oceny aktywności związków (1*R*,3*R*)-**24a**, (1*R*,3*S*)-**24a**, (1*S*,3*S*)-**24a**, (1*S*,3*R*)-**24a**, (1*R*,3*R*)-**25**, (1*S*,3*S*)-**25** oraz *mezo*-**25** wobec glutaminergicznych receptorów metabotropowych: mGluR₅, mGluR₇, i mGluR₈; niestety badane związki nie wykazały oczekiwanej aktywności agonistycznej.

5. WNIOSKI

5. WNIOSKI

- Dogodną metodą syntezy (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-**164** jest reakcja ulteniania za pomocą oksonu aminometylofosfonianu dietylu (*S*)-**170**, który można otrzymać w reakcji aza-Pudovika z odpowiedniej iminy i fosforynu dietylowego.
- Reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-**164** do alkoholu allilowego w obecności eteratu bromku magnezu prowadziła do utworzenia dwóch diastereoizomerycznych izoksazolidyn (*3R,5R,1'S*)-**173** oraz (*3S,5S,1'S*)-**173**.
- Prowadzenie reakcji wodorolizy pochodnych (*3R,5R,1'S*)-**173** oraz (*3S,5S,1'S*)-**173** w reaktorze ciśnieniowym skraca czas reakcji z 24 do 15 godzin i pozwala na ilościowe uzyskanie dioli (*1R,3R*)-**175** i (*1S,3S*)-**175**.
- Mieszaninę diastereoizomerów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu **161** można otrzymać z dobrymi wydajnościami w reakcji Abramova (1-amino-3-oksopropilo)fosfonianów dietylu (*R*)-**163** i (*S*)-**163** z fosforynem dietylowym.
- Efektywne rozdzielenie za pomocą RP-HPLC diastereoizomerycznej mieszaniny (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonianów **161** wymagało przekształcenia ich w pochodne *O*-acetylowe **176** albo *O*-4-nitrobenzoesowe **177**.
- W reakcji Kabachnika-Fieldsa aldehydu (*R*)-**163** lub (*S*)-**163** z fosforynem trietylowym i benzyloaminą powstała mieszanina diastereoizomerycznych (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu *anti*-**162** i *syn*-**162** (24:76).
- Dodatkowe centrum stereogeniczne aminy użytej w reakcji Kabachnika-Fieldsa ma wpływ na diastereoselektywność reakcji.
- Opracowana została alternatywna ścieżka syntezy (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu **162** wykorzystująca reakcję aza-Pudovika fosforynu trietylowego z iminą otrzymaną w wyniku addycji benzyloaminy do 1-(*N*-Boc-amino)-3-oksopropylfosfonianów dietylu **163**.
- Półpreparatywna wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych jest użyteczną techniką służącą do rozdzielania mieszanin diastereoizomerycznych difosfonianów.

- 1-(*N*-Boc-amino)-3-oksopropylfosfoniany dietylu (*R*)-**163** i (*S*)-**163** stanowią dogodne substraty w syntezie (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonianów **161** i (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu **162**.
- Użyteczna metoda syntezy kwasów difosfonowych **24a** i **25** polega na hydrolizie (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonianów **176** i (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu **183** w kwasie solnym.
- Konfiguracja absolutna na atomach C3 w estrach **161** została ustalona w oparciu o analizę widm ³¹P NMR pochodnej *anti*-**161** oraz enancjomerycznych par difosfonianów (*1R,3R*)-**161** i (*1S,3S*)-**161** otrzymanych odpowiednio z aldehydów (*R*)-**163** i (*S*)-**163**.
- Konfigurację absolutną otrzymanych związków **161** potwierdzono dodatkowo w oparciu o analizę przesunięć chemicznych w widmach ³¹P NMR *O*-metylomigdałowych pochodnych **181** wykorzystując regułę Spillinga.
- W celu ustalenia konfiguracji absolutnej na atomach C3 w estrach difosfonowych **162**, przekształcono je w pochodne [1,3-bis-(*N*-Boc-amino)prop-1,3-diylo]difosfonianowe **183**, a następnie w oparciu o analizę widm ¹H NMR ustalone zostały względne relacje między podstawnikami przy atomach C1 i C3 w związkach **183**.
- Związki (*1R,3R*)-**24a**, (*1R,3S*)-**24a**, (*1S,3S*)-**24a**, (*1S,3R*)-**24a**, (*1R,3R*)-**25**, (*1S,3S*)-**25** oraz *mezo*-**25** nie wykazywały oczekiwanej aktywności agonistycznej wobec glutaminergicznych receptorów metabotropowych: mGluR₅, mGluR₇ i mGluR₈.

6. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

6. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

6.1. Dane ogólne dotyczące syntezy związków

Temperatury topnienia otrzymanych związków oznaczyłam na aparacie „Boetius” i podałam niekorygowane.

Widma w podczerwieni wykonano na spektrometrze Bruker Alpha-T FT-IR; dla olejów w formie filmu, a dla ciał stałych jako wypraski w bromku potasu. Podałam jedynie pasma charakterystyczne dla poszczególnych związków.

Widma NMR wykonano na następujących spektrometrach:

^1H NMR – Varian Gemini 2000BB (200 MHz) oraz Bruker Avance III (600 MHz) stosując jako rozpuszczalniki CDCl_3 , CD_3OD , D_2O , C_6D_6 w obecności TMS jako wzorca wewnętrznego; ^{13}C NMR – Bruker Avance III (151.0 MHz); ^{31}P NMR – Varian Gemini 2000BB (80.9 MHz) i Bruker Avance III (243.0 MHz).

Analizy elementarne wykonano w Pracowni Analizy Elementarnej Zakładu Chemii Bioorganicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na przyrządzie Perkin Elmer PE 2400 CHNS.

Pomiary polarymetryczne zostały wykonane na aparacie Optical Activity PolAAR 3001.

Rozdzielenie diastereoizomerów przeprowadziłam za pomocą półpreparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej wykorzystując system Waters składający się z pompy Waters 2545, detektora UV Waters 2998 oraz autosamplera Waters 2767 wraz z kolektorem frakcji. Do kontroli aparatury wykorzystano oprogramowanie MassLynx (wersja 4.1). Rozdzielenie diastereoizomerów przeprowadzono na kolumnie XBridge C18 OBD, 5 μm (19 \times 100 mm) z przepływem 17 ml/min.

Przebieg reakcji kontrolowałam za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach TLC firmy Merck (nr katalogowy 1.05735.0001) pokrytych żelem krzemionkowym Kieselgel 60F254 stosując jako układy rozwijające mieszaniny: chloroform-metanol, chloroform-izopropanol, heksan-izopropanol, a następnie wywołując w parach jodu.

Chromatografie kolumnowe wykonywałam na żelu krzemionkowym firmy Merck 60 o granulacji 70 - 230 mesh (nr katalogowy 1.07734.9025).

Rozpuszczalniki oczyszczałam i suszyłam według metod opisanych w literaturze.¹⁷⁰⁻¹⁷²

Następujące związki otrzymałam według procedur opisanych w literaturze: hydroksymetylofosfonian dietylu **168**¹⁴⁴, szczawian (*S*)-*N*-(1-feniloetylo)hydroksyloaminy (*S*)-**166**¹⁷³, (*S*)-*N*-(1-feniloetylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitron (*S*)-**164**¹⁴⁸, (*3R,5R*)-[5-hydroksymetylo-2-(*S*)-(1-feniloetylo)izoksazolidyn-3-ylo]fosfonian dietylu (*3R,5R,1'S*)-**173**¹⁴⁸, (*3S,5S*)-[5-hydroksymetylo-2-(*S*)-(1-feniloetylo)izoksazolidyn-3-ylo]fosfonian dietylu (*3S,5S,1'S*)-**173**¹⁴⁸, (*3R,5R*)-[5-acetoksymetylo-2-(*S*)-(1-feniloetylo)izoksazolidyn-3-ylo]fosfonian dietylu (*3R,5R,1'S*)-**174**¹⁴⁸, (*3S,5S*)-[5-acetoksymetylo-2-(*S*)-(1-feniloetylo)izoksazolidyn-3-ylo]fosfonian dietylu (*3S,5S,1'S*)-**174**¹⁴⁸, (*1R,3R*)-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3,4-dihydroksybutylofosfonian dietylu (*1R,3R*)-**175**¹⁴², (*1S,3S*)-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3,4-dihydroksybutylofosfonian dietylu (*1S,3S*)-**175**¹⁴², (*R*)-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonian dietylu (*R*)-**163**¹⁴², (*S*)-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonian dietylu (*S*)-**163**¹⁴².

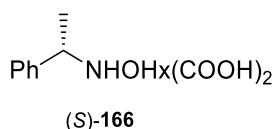
Handlowo dostępne odczynniki wykorzystane w pracy: (*S*)-1-feniloetyloamina, benzyloamina, trietyloamina, amoniak 25%, siarczan(VI) magnezu, siarczan(VI) sodu, *p*-metoksybenzaldehyd, kwas *m*-chloronadbenzoesowy, okson, chlorowodorek hydroksyloaminy, kwas szczawiowy, fosforyn dietylowy, fosforyn trietylowy, paraformaldehyd, chlorek oksalilu, dimetylosulfotlenek, nadjodan potasu, 4-dimetyloaminopirydyna, 1,2-dibromoetan, bezwodnik octowy, chlorek *p*-nitrobenzoilu. Pd(OH)₂/C, Pd/C, diwęglan di-*tert*-butylu.

6.2. Synteza (*S*)-*N*-(1-feniloetylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-**164**

6.2.1 Synteza szczawianu (*S*)-*N*-(1-feniloetylo)hydroksyloaminy (*S*)-**166**¹⁷³

Do kolby zawierającej siarczan(VI) magnezu (6.200 g, 51.50 mmol) w 18 ml chlorku metylenu dodałam w atmosferze argonu (*S*)-*N*-1-feniloetyloaminy (3.20 ml, 24.76 mmol) i *p*-metoksybenzaldehyd (3.40 ml 28.20 mmol). Zawartość kolby mieszałam na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny. Po odsączeniu siarczanu(VI) magnezu mieszaninę reakcyjną ochłodziłam do 0°C i dodałam zawiesinę 70% kwasu *m*-chloronadbenzoesowego (7.898 g, 45.77 mmol) w 15 ml chlorku metylenu. Reakcję prowadziłam w temperaturze 0 – 5°C przez 5 godzin, następnie przez 2.5 godziny w temperaturze pokojowej mieszając zawartość kolby na mieszadle magnetycznym. Mieszaninę poreakcyjną przesączyłam i przemywałam kolejno: 40 ml 0.5 M Na₂SO₃, 40 ml 0.5 M K₂CO₃ i 30 ml H₂O. Warstwę organiczną wysuszyłam nad siarczanem(VI) magnezu i zateżyłam na wyparce. Otrzymany olej rozpuściłam w 40 ml etanolu i ochłodziłam do 0°C. Dodałam chlorowodorek hydroksyloaminy (2.435 g, 35.00 mmol) w atmosferze argonu. Całość mieszałam przez 24

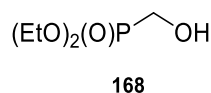
godziny w temperaturze pokojowej. Dodałam 45 ml chloroformu, odsączyłam powstały osad, a przesącz zatężyłam na wyparce. Otrzymany olej rozpuściłam w 15 ml wody i ekstrahowałam eterem dietylowym (2 × 30 ml). Do warstwy wodnej dodałam wodorowęglanu sodu i ekstrahowałam eterem dietylowym (5 × 30 ml). Otrzymany ekstrakt suszyłam nad siarczanem(VI) magnezu. Przesącz po odsączeniu środka suszącego przeniosłam do kolby zawierającej zawiesinę kwasu szczawiowego (2.929 g, 32.54 mmol) w 30 ml eteru dietylowego. Powstały osad odsączyłam uzyskując szczawian (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)hydroksyloaminy (*S*)-**166** (2.912 g, 52%) w postaci białego ciała stałego.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz; CD_3OD): $\delta = 7.52 - 7.44$ (m, 5H, H_{Ar}), 4.98 (bs, 1H, OH), 4.54 (q, 1H, $J = 6.9$ Hz, CHCH_3), 1.70 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz, CH_3CH).

6.2.2. Synteza hydroksymetylofosfonianu dietylu **168**¹⁴⁴

Do 37.00 ml fosforynu dietylu (39.664 g, 0.287 mol) dodałam kolejno paraformaldehyd (10.502 g, 0.350 mol), 100 ml bezwodnego etanolu i węglan potasu (1.98 g, 14.40 mmol). Zawartość kolby mieszałam w temperaturze 70°C przez 5 godzin. Mieszaninę odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość odparowałam z chloroformem. Produkt oczyściłam poprzez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem (zbierając frakcję w 100°C, 0.5 mmHg) uzyskując hydroksymetylofosfonian dietylu **168** (38.481 g, 80%) jako bezbarwną ciecz.



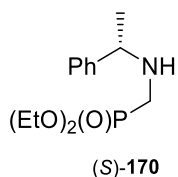
$^1\text{H NMR}$ (200 MHz; CDCl_3): $\delta = 4.90$ (s, 1H, OH), 4.28 – 4.13 (m, 4H, 2 × $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 3.91 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz, CH_2OH), 1.38 (t, 6H, $J = 7.1$ Hz, 2 × $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$).

$^{31}\text{P NMR}$ (80 MHz; CDCl_3): $\delta = 25.57$.

6.2.3. Synteza (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-164 – procedura A¹⁴⁸

Do kolby zawierającej chlorek oksalilu (3.20 ml, 37.20 mmol) w 45 ml chlorku metylenu wkropliłam dimetylosulfotlenek (5.55 ml, 78.00 mmol) w atmosferze argonu. Reakcję prowadziłam przez 40 minut w temperaturze -78°C . Po ociepleniu do temperatury pokojowej dodałam za pomocą kaniuli hydroksymetylofosfonianu dietylu **168** (4.43 ml 30.00 mmol) w 9 ml chlorku metylenu. Reakcję prowadziłam przez 4 godziny na mieszadle magnetycznym. Po tym czasie dodałam do kolby trietyloaminy (15.90 ml, 38.00 mmol) oraz szczawianu (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)hydroksyloaminy (*S*)-**166** (6.82 g, 30.00 mmol). Reakcję prowadziłam na mieszadle magnetycznym przez kolejne 3 godziny. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodałam 60 ml wodorowęglanu sodu i ekstrahowałam chlorkiem metylenu (3×30 ml). Po wykonaniu chromatografii Flash oraz krystalizacji wydzieliłam nitron (*S*)-**164** (4.000 g, 47%) jako białe ciało stałe.

6.2.4. Synteza (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu (*S*)-164 – Procedura B



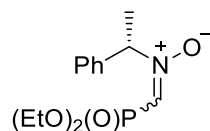
Do kolby zawierającej sita molekularne 4\AA , (*S*)-*N*-1-fenyletyloaminę (1.27 ml, 10.00 mmol), paraformaldehyd (0.300 g, 10.00 mmol) w 67 ml toluenu dodałam (57 μl , 1.00 mmol) kwasu octowego. Zawartość kolby mieszałam w temperaturze 80°C przez godzinę. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodałam fosforynu dietylowego (1.29 ml, 10.00 mmol). Zawartość kolby mieszałam w temperaturze wrzenia przez 5 godzin. Po tym czasie odsączyłam sita molekularne, pozostałość zateżyłam na wyparce. Otrzymałam aminometylofosfonian (*S*)-**170** (2.581 g) który został użyty bez oczyszczania w kolejnej reakcji.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.34 – 7.28 (m, 4H, H_{Ar}), 7.27 – 7.21 (m, 1H, H_{Ar}), 4.18 – 4.06 (m, 4H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 3.80 (q, 1H, $J = 6.6$ Hz, CHCH_3), 2.85 – 2.75 (m, 2H, CH_2P), 1.36 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, CH_3CH), 1.33 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 1.31 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$).

³¹P NMR (243 MHz, CDCl₃): δ = 26.63.

Otrzymany aminofosfonian (*S*)-**170** (2.581 g, 9.50 mmol) rozpuściłam w 45 ml acetonu, dodałam 51 ml wodnego roztworu wodorowęglanu sodu (3.360 g, 40.00 mmol). Mieszaninę reakcyjną ochłodziłam do 5°C i wkropliłam 170 ml wodnego roztworu oksonu (7.275 g, 11.83 mmol) utrzymując temperaturę poniżej 5°C. Zawartość kolby mieszałam przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu acetonu, pozostałość ekstrahowałam chlorkiem metylenu (3 × 150 ml). Warstwę organiczną wysuszyłam nad siarczanem(VI) sodu. Surowy produkt oczyściłam na żelu krzemionkowym w układzie chloroform-metanol (100 : 1, v/v) i poprzez krystalizację z mieszaniny eter dietylowy-heksan otrzymując nitron (*S*)-**164** (2.281 g, 80% z 2 etapów reakcji) w postaci białych kryształów.

(*S*)-*N*-(1-Fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitron (*S*)-**164**



(*S*)-**164**

R_f = 0.75 (chloroform-metanol, 10 : 1, v/v).

¹H NMR (600 MHz; CDCl₃): δ = 7.44 – 7.32 (m, 5H, *H*_{Ar}), 6.80 (d, 1H, *J* = 26.1 Hz, *H*_{CP}), 5.12 (q, 1H, *J* = 6.9 Hz, *CHCH*₃), 4.29 – 4.11 (m, 4H, 2 × *CH*₃*CH*₂OP), 1.80 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz, *CH*₃*CH*), 1.29 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, *CH*₃*CH*₂OP), 1.25 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, *CH*₃*CH*₂OP).

³¹P NMR (243 MHz, CDCl₃): δ = 6.22.

6.3. Synteza 1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonianów dietylu (*1R,3R*)-**163** i (*1S,3S*)-**163**

6.3.1. Synteza [5-hydroksymetylo-2-(*S*)-(1-fenyletylo)izoksazolidyn-3-ylo]fosfonianu dietylu (*3R,5R,1'S*)-**173** i (*3S,5S,1'S*)-**173**

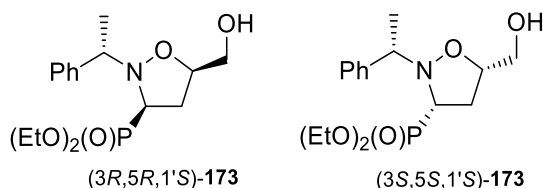
6.3.1.1. Reakcja cykloaddycji nitronu (*S*)-**164** do alkoholu allilowego – procedura ogólna¹⁴⁸

Do kolby zawierającej wyprażone wiórki magnezowe (5.00 mmol) dodałam w atmosferze argonu 25 ml eteru dietylowego i 1,2-dibromoetan (5.00 mmol). Zawartość kolby mieszałam w temperaturze wrzenia przez 40 minut. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodałam mieszaninę nitronu (*S*)-**164** (1.00 mmol) i alkoholu allilowego (5.00 mmol) rozpuszczonych w 1 ml chlorku metylenu. Całość mieszałam w temperaturze

pokojoyej przez 24 godziny. Surowy produkt oczyściłam na żelu krzemionkowym w układzie chloroform-metanol (100 : 1, v/v) otrzymując diastereoizomerycznych izoksazolidyn (*3R,5R,1'S*)-**173** i (*3S,5S,1'S*)-**173**.

6.3.1.2. Synteza 5-hydroksymetyloizoksazolidyn (*3R,5R,1'S*)-**173** i (*3S,5S,1'S*)-**173** i ich rozdział w postaci 5-acetoksyizoksazolidyn (*3R,5R,1'S*)-**174** i (*3S,5S,1'S*)-**174**¹⁴⁸

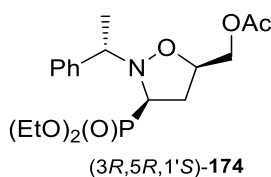
Postępując zgodnie z procedurą ogólną z punktu 6.3.1. z nitronu (*S*)-**164** (1.110 g, 3.88 mmol) i alkoholu allilowego (1.32 ml, 19.40 mmol) otrzymałam diastereoizomeryczne izoksazolidyny (*3R,5R,1'S*)-**173** i (*3S,5S,1'S*)-**173**, (1.20 g, 90%).



³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃): δ = 25.61, 24.63.

Do otrzymanej mieszaniny izoksazolidyn (*3R,5R,1'S*)-**173** i (*3S,5S,1'S*)-**173** (1.20 g, 3.50 mmol) rozpuszczonej w 12.5 ml chlorku metylenu dodałam bezwodnika octowego (0.99 ml, 7.06 mmol), trietyloaminę (1.61 ml, 17.14 mmol) oraz kilka kryształków 4-dimetyloaminopirydyny. Zawartość kolby mieszałam w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Mieszaninę poreakcyjną przemyłam wodą (4 × 15 ml), warstwę organiczną wysuszyłam nad siarczanem(VI) magnezu a następnie zatężyłam. Warstwę organiczną rozpuściłam w eterze dietylowym, a następnie przemyłam ponownie wodą (3 × 10 ml), warstwy wodne przemyłam chlorkiem metylenu (3 × 25 ml). Połączone ekstrakty organiczne wysuszyłam nad siarczanem(VI) magnezu. Po zatężeniu, surowy produkt oczyściłam wykonując chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym stosując jako eluent mieszaninę rozpuszczalników heksan-izopropanol (50 : 1, v/v) otrzymując (*3R,5R,1'S*)-**174** (0.350 g, 25%) oraz (*3S,5S,1'S*)-**174** (0.251 g, 19%) jako lekko żółte oleje.

(*3R,5R*)-[5-acetoksymetylo-2-(*S*)-(1-fenyletylo)izoksazolidyn-3-yl]fosfonian dietylu
(*3R,5R,1'S*)-**174**¹⁴⁸

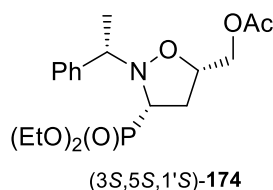


R_f = 0.23 (heksan-izopropanol, 10 : 1, v/v).

^1H NMR (200 MHz; CDCl_3): $\delta = 7.43 - 7.27$ (m, 5H, H_{Ar}), 4.33 – 4.08 (m, 7H, $2 \times \text{HC}1'$, $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$, HCCH_3), 3.99 – 3.86 (m, 1H, $\text{HC}5$), 3.35 (ddd, 1H, $J = 4.3$ Hz, $J = 8.5$ Hz, $J = 12.8$ Hz, $\text{HC}3$), 2.47 – 2.09 (m, 2H, $2 \times \text{HC}4$), 2.04 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$), 1.56 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz, CH_3CH), 1.37 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 1.31 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$).

^{31}P NMR (81 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.41$.

(3*S*,5*S*)-5-acetoksymetylo-2-[(*S*)-(1-fenyletylo)izoksazolidyn-3-yl]fosfonian dietylu
(3*S*,5*S*,1'*S*)-**174**¹⁴⁸



R_f = 0.16 (heksan-izopropanol, 10 : 1, v/v).

^1H NMR (200 MHz; CDCl_3): $\delta = 7.36 - 7.28$ (m, 5H, H_{Ar}), 4.54 – 4.41 (m, 1H, $\text{HC}5$), 4.37 – 3.76 (m, 7H, $2 \times \text{HC}1'$, $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$, HCCH_3), 3.53 – 3.41 (m, 1H, $\text{HC}3$), 2.80 – 2.54 (m, 1H, $\text{HC}4$), 2.33 – 2.11 (m, 1H, $\text{HC}4$), 2.10 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$), 1.48 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, CH_3CH), 1.31 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 1.21 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$).

^{31}P NMR (81 MHz, CDCl_3): $\delta = 24.08$.

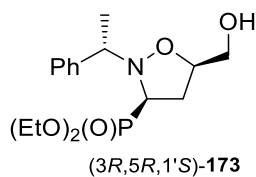
6.3.1.2.1. Usunięcie acetylowej grupy ochronnej z izoksazolidyn (3*R*,5*R*,1'*S*)-**174** i (3*S*,5*S*,1'*S*)-**174**

Procedura ogólna¹⁴⁸

Do odpowiedniego 5-acetoksymetylo-2-[(*S*)-(1-fenyletylo)izoksazolidyn-3-yl]fosfonianu dietylu (3*R*,5*R*,1'*S*)-**174** lub (3*S*,5*S*,1'*S*)-**174** (1.00 mmol) rozpuszczonego w alkoholu etylowym (10 ml) dodałam 25% wodnego roztworu amoniaku (15ml). Zawartość kolby mieszałam w temperaturze pokojowej przez 5 godzin. Mieszaninę reakcyjną zatężyłam z etanolem. Surowy produkt oczyściłam wykonując chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym stosując jako eluent mieszaninę rozpuszczalników chloroform-metanol (50 : 1, v/v). Otrzymałam czysty (3*R*,5*R*)- lub (3*S*,5*S*)-5-hydroksymetylo-2-[(*S*)-(1-fenyletylo)izoksazolidyn-3-yl]fosfonian dietylu **173**.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.3.1.2.1. z octanu (3*R*,5*R*,1'*S*)-**174** (0.220 g, 0.57 mmol) otrzymałam fosfonianu (3*R*,5*R*,1'*S*)-**173** (0.179 g, 91%) jako bezbarwny olej.

(3*R*,5*R*)-[5-hydroksymetylo-2-(*S*)-(1-fenyloetylo)izoksazolidyn-3-ylo]fosfonian dietylu
(3*R*,5*R*,1'*S*)-**173**¹⁴⁸



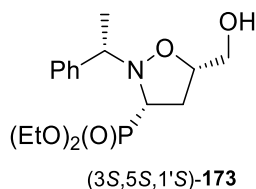
Rf = 0.68 (chloroform-metanol, 10 : 1, *v/v*).

¹H NMR (200 MHz; CDCl₃): δ = 7.41 – 7.28 (m, 5H, *H*_{Ar}), 4.38 – 4.97 (m, 6H, 2 × CH₃CH₂OP, *HC*5, *CH*CH₃), 3.73 (dd, 1H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 12.6 Hz, *HC*1'), 3.64 – 3.48 (m, 2H, *HC*1', *HC*3), 2.69 – 2.29 (m, 2H, 2 × *HC*4), 1.47 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz, CH₃CH), 1.38 (dt, 3H, *J* = 0.5, Hz, *J* = 7.1 Hz, CH₃CH₂OP), 1.36 (dt, 3H, *J* = 0.5, Hz, *J* = 7.1 Hz, CH₃CH₂OP).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃): δ = 24.63.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną 6.3.1.2.1. z octanu (3*S*,5*S*,1'*S*)-**174** (0.169 g, 0.44 mmol) otrzymałam izoksazolidyny (3*S*,5*S*,1'*S*)-**173** (0.140 g, 93%) jako bezbarwny olej.

(3*S*,5*S*)-5-[hydroksymetylo-2-(*S*)-(1-fenyloetylo)izoksazolidyn-3-ylo]fosfonian dietylu
(3*S*,5*S*,1'*S*)-**173**¹⁴⁸



Rf = 0.68 (chloroform-metanol, 10 : 1, *v/v*).

¹H NMR (200 MHz; CDCl₃): δ = 7.35 – 7.29 (m, 5H, *H*_{Ar}), 4.53 – 4.45 (m, 1H, *HC*5), 4.29 – 3.95 (m, 5H, 2 × CH₃CH₂OP, *CH*CH₃), 3.87 – 3.76 (m, 1H, *HC*1'), 3.67 (dd, 1H, *J* = 3.0 Hz, *J* = 12.8 Hz, *HC*1'), 3.48 – 3.36 (m, 1H, *HC*3), 2.68 – 3.50 (m, 2H, 2 × *HC*4), 1.50 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, CH₃CH), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃CH₂OP), 1.23 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃CH₂OP).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃): δ = 25.61.

6.3.2. Synteza 5-hydroksymetyloizokzasolidyn (**3R,5R,1'S**)-**173** i (**3S,5S,1'S**)-**173** oraz ich rozdzielanie za pomocą RP-HPLC

Postępując zgodnie z procedurą ogólną z opisaną w rozdziale 6.3.1. z nitronu (**S**)-**164** (2.860 g, 10.02 mmol), alkoholu allilowego (3.40 ml, 50.10 mmol) otrzymałam diastereoizomeryczne izoksazolidyny, które wstępnie oczyściłam na żelu krzemionkowym w układzie chloroform-izopropanol (100 : 1, v/v), a czyste diastereoizomery wydzieliłam za pomocą HPLC otrzymując izoksazolidyny (**3R,5R,1'S**)-**173** (1.242 g, 36%) oraz (**3S,5S,1'S**)-**173** (1.123 g, 33%) jako bezbarwne oleje.

(**3R,5R,1'S**)-**173**

t_R = 15.26 min. (woda-izopropanol 86.5 : 13.5, v/v).

(**3S,5S,1'S**)-**173**

t_R = 18.80 min. (woda-izopropanol 86.5 : 13.5, v/v).

6.3.3. Synteza 1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3,4-dihydroksybutylofosfonianów dietylu (**1R,3R**)-**175** i (**1S,3S**)-**175**

6.3.3.1. Procedura ogólna A¹⁴²

Do odpowiedniego fosfonianu (**3R,5R,1'S**)-**173** (1.00 mmol) lub (**3S,5S,1'S**)-**173** (1.00 mmol) rozpuszczonego w 1.75 ml alkoholu etylowego dodałam diwęglanu di-*tert*-butyłu (1.00 mmol) oraz katalityczną ilość 20% Pd(OH)₂/C (0.10 mmol). Przepuściłam strumień gazu obojętnego (argon), a następnie rozpoczęłam wodorolizę dołączając balon wypełniony wodorem. Po 24 godzinach przez mieszaninę poreakcyjną przepuściłam strumień argonu, a następnie przesaczyłam przez warstwę Celitu nasączonego etanolem. Otrzymałam odpowiedni (3,4-dihydroksybutylofosfonian dietylu (**1R,3R**)-**175** lub (**1S,3S**)-**175** jako bezbarwny olej.

6.3.3.2. Procedura ogólna B

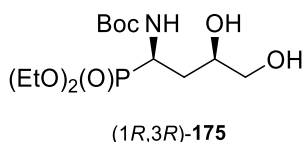
Do odpowiedniego fosfonianu (**3R,5R,1'S**)-**173** (1.00 mmol) lub (**3S,5S,1'S**)-**173** (1.00 mmol) rozpuszczonego w 11.2 ml alkoholu etylowym dodałam diwęglanu di-*tert*-butyłu (1.20 mmol) oraz katalityczną ilość 20% Pd(OH)₂/C (0.10 mmol). Przepuściłam strumień gazu obojętnego (argon), a następnie rozpoczęłam wodorolizę w reaktorze pod ciśnieniem 12 bar. Po 12 godzinach przez mieszaninę poreakcyjną przepuściłam strumień argonu, a następnie przesaczyłam przez warstwę Celitu nasączonego etanolem. Otrzymałam

odpowiedni 3,4-dihydroksybutylofosfonian dietylu (*1R,3R*)-**175** lub (*1S,3S*)-**175** jako bezbarwny olej.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną A opisaną w rozdziale 6.3.3.1. z izoksazolidyny (*3R,5R,1'S*)-**173** (0.725 g, 2.09 mmol) i diwęglanu di-*tert*-butylu (0.455 g, 2.58 mmol) otrzymałam 3,4-dihydroksybutylofosfonian dietylu (*1R,3R*)-**175** (0.493 g, 72%) jako bezbarwny olej.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną B opisaną w rozdziale 6.3.3.2. z izoksazolidyny (*3R,5R,1'S*)-**173** (0.157 g, 0.45 mmol) i diwęglanu di-*tert*-butylu (0.118 g, 0.54 mmol) otrzymałam 3,4-dihydroksybutylofosfonian dietylu (*1R,3R*)-**175** (0.144 g, 99%) jako bezbarwny olej.

(*1R,3R*)-1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3,4-dihydroksybutylofosfonian dietylu (*1R,3R*)-**175**



R_f = 0.48 (chloroform-metanol, 10 : 1, v/v).

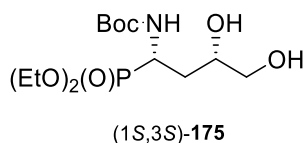
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 5.03 (br d 1H, *J* = 8.4, Hz, NH), 4.28 – 4.03 (m, 4H, 2 × CH₃CH₂OP), 4.01 – 3.80 (m, 1H, CHNH), 3.74 – 3.41 (m, 2H, CH₂OH), 2.62 – 2.44 (m, 1H, CHOH), 2.14 – 1.71 (m, 2H, CH₂), 1.44 (s, 9H, 3 × CH₃), 1.33 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, 2 × CH₃CH₂OP).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃): δ = 25.74.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną A opisaną w rozdziale 6.3.3.1. z izoksazolidyny (*3S,5S,1'S*)-**173** (0.490 g, 1.43 mmol) i diwęglanu di-*tert*-butylu (0.374 g, 1.72 mmol) otrzymałam 3,4-dihydroksybutylofosfonian dietylu (*1S,3S*)-**175** (0.314 g, 68%) jako bezbarwny olej.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną B opisaną w rozdziale 6.3.3.2. z izoksazolidyny (*3S,5S,1'S*)-**173** (0.206 g, 0.59 mmol) i diwęglanu di-*tert*-butylu (0.156 g, 0.71 mmol) 3,4-dihydroksybutylofosfonian dietylu (*1S,3S*)-**175** (0.181 g, 95%) jako bezbarwny olej.

(1*S*,3*S*)-1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3,4-dihydroksybutylofosfonian dietylu (1*S*,3*S*)-**175**



R_f = 0.48 (chloroform-metanol, 10 : 1, v/v).

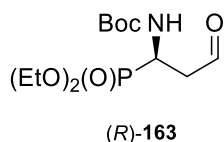
6.3.4. Synteza 1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonianów dietylu (*R*)-**163** oraz (*S*)-**163**¹⁴²

Procedura ogólna

Do odpowiedniego 3,4-dihydroksybutylofosfonianu (1*R*,3*R*)-**175** lub (1*S*,3*S*)-**175** (1.00 mmol) w mieszaninie 5 ml wody i 10 ml chlorku metylenu dodałam nadjodan sodu (1.20 mmol). Zawartość kolby mieszałam przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po oddzieleniu warstwy organicznej, warstwę wodną ekstrahowałam chlorkiem metylenu (3 × 12 ml). Warstwę organiczną wysuszyłam nad siarczanem(VI) magnezu, a następnie zatężyłam. Otrzymałam surowe aldehydy (*R*)-**163** lub (*S*)-**163**, które bez oczyszczania zostały użyte do dalszych reakcji.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną ogólną opisaną w rozdziale 6.3.4. z 3,4-dihydroksybutylofosfonianu dietylu (1*R*,3*R*)-**165** (0.256 g, 0.75 mmol) i nadjodanu potasu (0.207 g, 0.90 mmol) otrzymałam aldehyd (*R*)-**163** (0.217 g, 93%) jako bezbarwny olej.

(*R*)-1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonian dietylu (*R*)-**163**¹⁴²

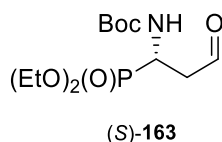


¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 9.73 (dd, 1H, *J* = 1.3 Hz, *J* = 2.2 Hz, CHO), 4.98 (br d, 1H, *J* = 9.9 Hz, NH), 4.73 – 4.41 (m, 1H, CH₂P), 4.28 – 4.03 (m, 4H, 2 × CH₃CH₂OP), 2.99 – 2.58 (m, 2H, CH₂), 1.43 (s, 9H, 3 × CH₃), 1.33 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, CH₃CH₂OP), 1.32 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, CH₃CH₂OP).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃): δ = 23.15.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.3.4. z 3,4-dihydroksybutylofosfonianu dietylu (1*S*,3*S*)-**165** (0.305 g, 0.89 mmol) i nadjodanu potasu (0.245 g, 1.07 mmol) otrzymałam aldehyd (*S*)-**163** (0.256 g, 93%) jako bezbarwny olej.

(*S*)-1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonian dietylu (*S*)-**163**¹⁴²



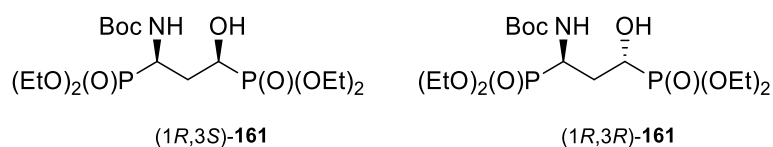
6.4. Synteza [1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-hydroksypropano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu (1*R*,3*S*)-**161** i (1*R*,3*R*)-**161** oraz (1*S*,3*R*)-**161** i (1*S*,3*S*)-**161**

Procedura ogólna

Do roztworu aldehydu (*R*)-**163** lub (*S*)-**163** (1.00 mmol) dodałam fosforynu dietylu (5.00 mmol) oraz katalityczną ilość trietyloaminy (0.10 mmol). Zawartość kolby mieszałam w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Surowy produkt oczyściłam na żelu krzemionkowym otrzymując diastereoizomeryczne 3-hydroksydifosfoniany (1*R*,3*S*)-**161** i (1*R*,3*R*)-**161** oraz (1*S*,3*R*)-**161** i (1*S*,3*S*)-**161**.

(1*R*,3*S*)- i (1*R*,3*R*)-[1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-hydroksypropano-1,3-diylo]fosfoniany tetraetylu (1*R*,3*S*)-**161** i (1*R*,3*R*)-**161**

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.4. z aldehydu (*R*)-**163** (0.292 g, 0.90 mmol) i fosforynu dietylu (578 μ l, 4.49 mmol) otrzymałam diastereoizomeryczne 3-hydroksydifosfoniany (1*R*,3*S*)-**161** i (1*R*,3*R*)-**161** (0.296 g, 76%).



³¹P NMR (243 MHz, CDCl₃): δ = 25.26, 24.60 (d, J = 8.0 Hz), 24.03 (d, J = 8.0 Hz), 23.58.

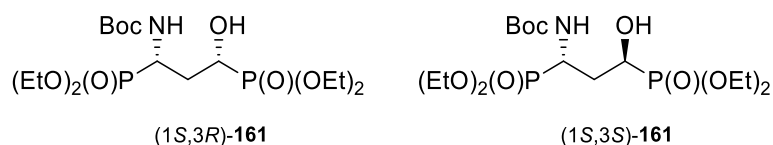
Analiza elementarna dla C₁₆H₃₅NO₉P₂ \times 0.25 H₂O:

obliczono: C, 42.53; H, 7.92; N, 3.10.

oznaczono: C, 42.33; H, 7.91; N, 3.02.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.4. z aldehydu (*S*)-**163** (0.308 g, 0.95 mmol) i fosforynu dietylu (0.612 ml, 4.75 mmol) otrzymałam diastereoizomeryczne 3-hydroksydifosfoniany (*1S,3R*)-**161** i (*1S,3S*)-**161** (0.298 g, 72%).

(*1S,3R*)- i (*1S,3S*)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-hydroksypropano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu (*1S,3R*)-**161** i (*1S,3S*)-**161**



Analiza elementarna dla $\text{C}_{16}\text{H}_{35}\text{NO}_9\text{P}_2 \times 0.25 \text{ H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 42.53; H, 7.92; N, 3.10.

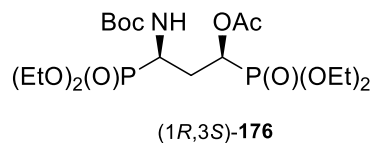
oznaczono: C, 42.38; H, 8.11; N, 3.18.

6.4.1. Synteza [3-acetoksy-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu (*1R,3R*)-**161** i (*1R,3S*)-**161** lub (*1S,3R*)-**161** i (*1S,3S*)-**161**

Procedura ogólna

Do mieszaniny 3-hydroksydifosfonianów (*1S,3R*)-**161** i (*1S,3S*)-**161** (1.00 mmol) lub (*1R,3R*)-**161** i (*1R,3S*)-**161** (1.00 mmol) rozpuszczonych w 3.5 ml chlorku metylenu dodałam bezwodnika octowego (3.00 mmol), trietyloaminę (3.00 mmol) oraz katalityczne ilości 4-dimetyloaminopirydyny (0.05 mmol). Zawartość kolby mieszałam w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Mieszaninę reakcyjną przemyłam wodą (3 × 5 ml), a warstwę organiczną wysuszyłam nad siarczanem(VI) magnezu. Mieszaninę poreakcyjną oczyściłam na żelu krzemionkowym w układzie chloroform-izopropanol (100 : 1, v/v) zateżyłam, a czyste diastereoizomery wydzieliłam za pomocą HPLC otrzymując (*1R,3R*)-**176** i (*1R,3S*)-**176** lub (*1S,3R*)-**176** i (*1S,3S*)-**176**

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.4.1. z mieszaniny 3-hydroksydifosfonianów (*1R,3S*)-**161** i (*1R,3R*)-**161** (0.149 g, 0.33 mmol) i bezwodnika octowego (82 μl, 0.87 mmol) otrzymałam 3-acetoksydifosfoniany (*1R,3S*)-**176** (0.037 g, 22%) jako bezbarwny olej i (*1R,3R*)-**176** (0.067 g, 40%) jako białe ciało stałe.

(1R,3S)-[3-Acetoksy-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (*1R,3S*)-**176**

$t_R = 10.69$ min. (woda-acetonitryl, 70 : 30, v/v).

$[\alpha]_D^{20} = +3.27$ (*c* 1.04 CHCl₃).

IR (film): $\nu = 3249, 2982, 2934, 1752, 1708, 1532, 1296, 1222, 1024, 969$ cm⁻¹.

¹H NMR (600 MHz; CDCl₃): $\delta = 5.38$ (ddd, 1H, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.9$ Hz, $J = 13.7$ Hz, HC3), 4.92 (d, 1H $J = 10.3$ Hz, NH), 4.22 – 4.05 (m, 9H, 4 × CH₃CH₂OP, HC1), 2.47 – 2.39 (m, 1H, H_aC2), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.09 – 1.99 (m, 1H, H_bC2), 1.41 (s, 9H, 3 × CH₃), 1.33 – 1.26 (m, 12H, 4 × CH₃CH₂OP).

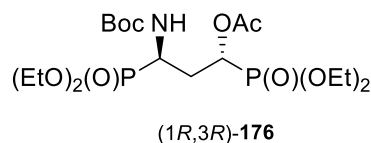
¹³C NMR (151 MHz; CDCl₃): $\delta = 169.85$ (d, $^3J_{\text{COCP}} = 5.1$ Hz), 154.97 (d, $^3J_{\text{CNCP}} = 5.4$ Hz), 80.33, 65.60 (dd, $^3J_{\text{CCCP}} = 12.2$ Hz, $^1J_{\text{CP}} = 168.7$ Hz), 63.20 (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.1$ Hz), 63.15 (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.0$ Hz), 62.79 (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.1$ Hz), 62.72 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.7$ Hz), 53.56, 44.88 (dd, $^3J_{\text{CCCP}} = 12.4$ Hz, $^1J_{\text{CP}} = 158.0$ Hz), 28.86 (dd, $^2J_{\text{CCP}} = 3.9$ Hz, $^2J_{\text{CCP}} = 7.3$ Hz), 28.39 (3 × CH₃), 21.01, 16.59 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 4.0$ Hz), 16.56 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 3.8$ Hz), 16.38 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 6.0$ Hz), 16.46 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 6.6$ Hz).

³¹P NMR (243 MHz; CDCl₃): $\delta = 23.55$ (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 4.2$ Hz), 19.83 (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 4.2$ Hz).

Analiza elementarna dla C₁₈H₃₇NO₁₀P₂:

obliczono: C, 44.18; H, 7.62; N, 2.86.

oznaczono: C, 44.01; H, 7.82; N, 2.90.

(1R,3R)-[3-Acetoksy-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (*1R,3R*)-**176**

$T_{\text{top.}} = 84 - 88^\circ\text{C}$.

$t_R = 12.67$ min. (woda-acetonitryl, 70 : 30, v/v).

$[\alpha]_D^{20} = -21.80$ (*c* 1.22, CHCl₃).

IR (KBr): $\nu = 3289, 2983, 2935, 1749, 1710, 1251, 1225, 1024, 978$ cm⁻¹.

^1H NMR (600 MHz; CDCl_3): $\delta = \delta$ 5.39 (ddd, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.5$ Hz, $J = 11.5$ Hz, HC3), 4.67 (d, 1H $J = 10.8$ Hz, NH), 4.39 – 3.96 (m, 9H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$, HC1), 2.58 – 2.32 (m, 1H, $H_a\text{C}2$), 2.14 (s, 3H, CH_3), 2.14 – 2.07 (m, 1H, $H_b\text{C}2$), 1.44 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1.36 – 1.31 (m, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$).

^{13}C NMR (151 MHz; CDCl_3): $\delta =$ 169.52 (d, $^3J_{\text{COCP}} = 2.1$ Hz), 155.07 (d, $^3J_{\text{CNCP}} = 4.0$ Hz), 80.47, 63.13 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.2$ Hz), 62.97 (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.2$ Hz), 62.89 (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.1$ Hz), 62.78 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.5$ Hz), 62.66 (dd, $^3J_{\text{CCCP}} = 13.6$ Hz, $^1J_{\text{CP}} = 167.3$ Hz), 42.53 (dd, $^3J_{\text{CCCP}} = 14.3$ Hz, $^1J_{\text{CP}} = 158.8$ Hz), 28.95 (dd, $^2J_{\text{CCP}} = 3.9$ Hz, $^2J_{\text{CCP}} = 7.3$ Hz), 28.30 ($3 \times \text{CH}_3$), 20.74, 16.55 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.6$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$), 16.46 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 6.0$ Hz), 16.45 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 6.9$ Hz).

^{31}P NMR (243 MHz; CDCl_3): $\delta =$ 24.42 (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 7.8$ Hz), 20.54 (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 7.8$ Hz).

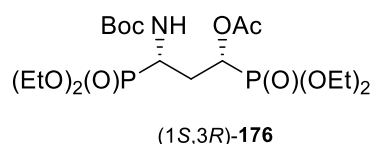
Analiza elementarna dla $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NO}_{10}\text{P}_2$:

obliczono: C, 44.18; H, 7.62; N, 2.86.

oznaczono: C, 44.12; H, 7.95; N, 2.91.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.4.1. z mieszaniny 3-hydroksydifosfonianów (1*S*,3*R*)-**161** i (1*S*,3*S*)-**161** (0.098g, 0.22 mmol) i bezwodnika octowego (0.064 ml, 0.45 mmol) otrzymałam 3-acetoksydifosfoniany (1*S*,3*R*)-**176** (0.022 g, 20%) jako bezbarwny olej oraz (1*S*,3*S*)-**176** (0.036 g, 32%) jako białe ciało stałe.

(1*S*,3*R*)-[3-Acetoksy-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-dylo]difosfonian tetraetylu (1*S*,3*R*)-**176**



$t_r = 10.69$ min. (woda-acetonitryl, 70 : 30, v/v).

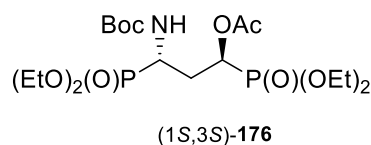
$[\alpha]_D^{20} = -3.45$ (c 1.10; CHCl_3).

Analiza elementarna dla $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NO}_{10}\text{P}_2$:

obliczono: C, 44.18; H, 7.62; N, 2.86.

oznaczono: C, 44.00; H, 7.88; N, 2.96.

(1*S*,3*S*)-[3-Acetoksy-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*S*,3*S*)-**176**



$T_{\text{top}} = 84 - 88^{\circ}\text{C}$.

$t_{\text{R}} = 12.67$ min. (woda-acetonitryl, 70 : 30, v/v).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20.30$ (c 1.01, CHCl_3).

Analiza elementarna dla $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NO}_{10}\text{P}_2$:

obliczono: C, 44.18; H, 7.62; N, 2.86.

oznaczono: C, 44.11; H, 7.85; N, 2.97.

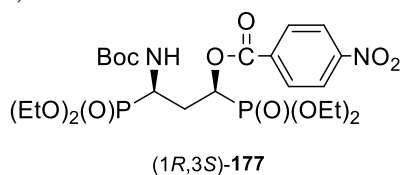
6.4.2. Synteza [1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-(4-nitrobenzoilo)propano-1,3-diylo]difosfonianów tetraetylu (1*R*,3*S*)-**177**, (1*R*,3*R*)-**177**, (1*S*,3*R*)-**177** oraz (1*S*,3*S*)-**177**

Procedura ogólna

Do mieszaniny 3-hydroksydifosfonianów (1*R*,3*S*)-**161** i (1*R*,3*R*)-**161** (1.00 mmol) lub (1*S*,3*R*)-**161** i (1*S*,3*S*)-**161** rozpuszczonych w 1 ml chlorku metylenu dodałam chlorku 4-nitrobenzoilu (1.50 mmol), trietyloaminę (2.00 mmol) oraz katalityczne ilości 4-dimetyloaminopirydyny (0.05 mmol). Zawartość kolby mieszałam w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Mieszaninę poreakcyjną przemyłam wodą (3×5 ml), a warstwę organiczną wysuszyłam nad siarczanem(VI) sodu. Warstwę organiczną zatężyłam, a czyste diastereoizomery wydzieliłam za pomocą HPLC, otrzymując 3-(4-nitrobenzoilo)difosfoniany (1*R*,3*S*)-**177** i (1*R*,3*R*)-**177** oraz (1*S*,3*R*)-**177** i (1*S*,3*S*)-**177**.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.4.2. z mieszaniny 3-hydroksydifosfonianów (1*R*,3*S*)-**161** i (1*R*,3*R*)-**161** (0.099 g, 0.22 mmol) oraz chlorku 4-nitrobenzoilu (0.064 g, 0.34 mmol) otrzymałam 3-(4-nitrobenzoilo)difosfoniany (1*R*,3*S*)-**177** (0.029 g, 21%) jako żółtawy olej oraz (1*R*,3*R*)-**177** (0.043 g, 33%) jako białe ciało stałe.

(1*R*,3*S*)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-(4-nitrobenzoilo)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*R*,3*S*)-177



$t_R = 14.89$ min. (woda-acetonitryl, 62 : 38, v/v).

$[\alpha]_D^{20} = -4.60$ (c 2.65, CHCl_3).

IR (film): $\nu = 3290, 3050, 2982, 2932, 1739, 1704, 1530, 1394, 1367, 1243, 1053, 1024, 716 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz; CDCl_3): $\delta = 8.33$ (d, 2H, $^3J = 8.9$ Hz, H_{Ar}), 8.28 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H_{Ar}), 5.72 (ddd, 1H, $J = 4.4$ Hz, $J = 9.0$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $HC3$), 4.98 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, NH), 4.32 – 4.26 (m, 1H, $HC1$), 4.25 – 4.09 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 2.66 – 2.58 (m, 1H, H_aC2), 2.35 – 2.26 (m, 1H, H_bC2), 1.36 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1.35 – 1.32 (m, 12H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz; CDCl_3): $\delta = 163.50$ (d, $^3J_{\text{COP}} = 4.2$ Hz), 154.85 (d, $^3J_{\text{CNCP}} = 5.6$ Hz), 150.75, 134.49, 131.06, 123.61, 80.26, 67.18 (dd, $^1J_{\text{CP}} = 11.7$ Hz, $^3J_{\text{CCCP}} = 168.0$ Hz), 63.21 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.5$ Hz), 63.17 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.2$ Hz), 63.10 (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.2$ Hz), 62.69 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.8$ Hz), 44.85 (dd, $^3J_{\text{CCCP}} = 12.7$ Hz, $^1J_{\text{CP}} = 157.4$ Hz), 30.59 (d, $^2J_{\text{CCP}} = 3.0$ Hz), 28.13 ($3 \times \text{CH}_3$), 16.49 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.4$ Hz), 16.41 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.7$ Hz), 16.40 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.7$ Hz), 16.32 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.9$ Hz).

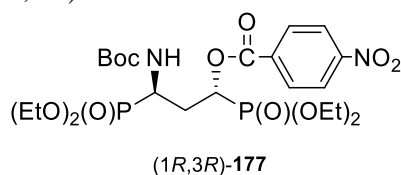
$^{31}\text{P NMR}$ (243 MHz; CDCl_3): $\delta = 23.33$ (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 2.7$ Hz), 18.96 (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 2.7$ Hz).

Analiza elementarna dla $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}_2$:

obliczono: C, 46.31; H, 6.42; N, 4.70

oznaczono: C, 46.13; H, 6.32; N, 4.71.

(1*R*,3*R*)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-(4-nitrobenzoilo)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*R*,3*R*)-177



$T_{\text{top}} = 125 - 126^\circ\text{C}$.

$t_R = 18.14$ min. (woda-acetonitryl, 62 : 38, v/v).

$[\alpha]_D^{20} = -41.34$ (c 0.82, CHCl_3).

IR (KBr): $\nu = 3288, 3049, 2982, 2930, 1740, 1704, 1530, 1368, 1393, 1243, 1053, 1024, 716$ cm^{-1} .

^1H NMR (600 MHz; CDCl_3): $\delta = 8.32$ (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H_{Ar}), 8.22 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H_{Ar}), 5.69 (ddd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 8.3$ Hz, $J = 12.5$ Hz, $HC3$), 4.74 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, NH), $4.27 - 4.11$ (m, 9H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$, $HC1$), $2.67 - 2.61$ (m, 1H, H_aC2), $2.27 - 2.21$ (m, 1H, H_bC2), 1.40 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), $1.35 - 1.30$ (m, 12H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$).

^{13}C NMR (151 MHz; CDCl_3) $\delta = 163.29$ (d, $^3J_{\text{COP}} = 2.3$ Hz), 154.85 (d, $^3J_{\text{CNCP}} = 4.3$ Hz), $150.64, 135.01, 130.85, 123.61, 80.42, 64.23$ (dd, $^3J_{\text{CCCP}} = 13.5$ Hz, $^1J_{\text{CP}} = 167.7$ Hz), 63.24 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.2$ Hz), 63.02 (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.1$ Hz), 62.83 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.5$ Hz), 62.79 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.1$ Hz), 42.58 (dd, $^3J_{\text{CCCP}} = 14.2$ Hz, $^1J_{\text{CP}} = 158.6$ Hz), 29.17 ($^2J_{\text{CCP}} = 3.3$ Hz, $^2J_{\text{CCP}} = 7.3$ Hz), 28.16 ($3 \times \text{CH}_3$), 16.48 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.6$ Hz), 16.42 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.8$ Hz), 16.36 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.9$ Hz), 16.32 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.9$ Hz).

^{31}P NMR (243 MHz; CDCl_3): $\delta = 24.10$ (d, $J_{\text{PCCCP}} = 7.6$ Hz), 19.69 (d, $J_{\text{PCCCP}} = 7.6$ Hz).

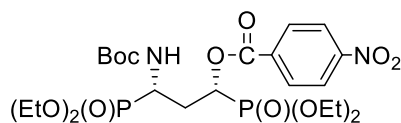
Analiza elementarna dla $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}_2$:

obliczono: C, 46.31; H, 6.42; N, 4.70.

oznaczono: C, 46.29; H, 6.43, N, 4.59.

Postępując zgodnie z ogólną procedurą opisaną w rozdziale 6.4.2. z mieszaniny 3-hydroksydifosfonianów (1*S*,3*R*)-**161** i (1*S*,3*S*)-**161** (0.094 g, 0.21 mmol) i chlorku 4-nitrobenzoilu (0.060 g, 0.33 mmol) otrzymałam 3-(4-nitrobenzoilo)difosfonian (1*S*,3*R*)-**177** (0.022 g, 18%) jako jasnożółty olej oraz (1*S*,3*S*)-**177** (0.018 g, 14%) jako białe ciało stałe.

(1*S*,3*R*)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-(4-nitrobenzoilo)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*S*,3*R*)-**177**



(1*S*,3*R*)-**177**

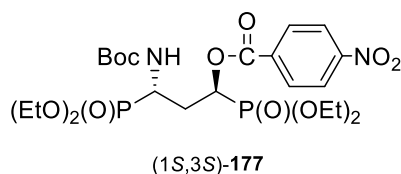
$[\alpha]_D^{20} = +2.78$ (c 2.16, CHCl_3).

Analiza elementarna dla C₂₃H₃₈N₂O₁₂P₂:

obliczono: C, 46.31; H, 6.42; N, 4.70.

oznaczono: C, 46.18; H, 6.49; N, 4.73.

(1S,3S)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-(4-nitrobenzoilo)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (*1S,3S*)-**177**



T_{top} = 116 – 118°C.

$[\alpha]_D^{20} = +40.60$ (*c* 0.83, CHCl₃)

Analiza elementarna dla C₂₃H₃₈N₂O₁₂P₂:

obliczono: C, 46.31; H, 6.42; N, 4.70.

oznaczono: C, 46.60; H, 6.64; N, 4.71.

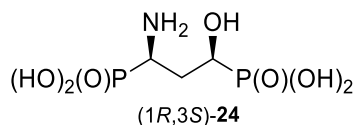
6.5. Synteza kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych (1*R,3S*)-24**, (1*S,3R*)-**24**, (1*R,3R*)-**24**, (1*S,3S*)-**24**, (1*R,3S*)-**24a**, (1*S,3R*)-**24a**, (1*R,3R*)-**24a** oraz (1*S,3S*)-**24a****

6.5.1 Synteza kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych (1*R,3S*)-24**, (1*S,3R*)-**24**, (1*R,3R*)-**24**, (1*S,3S*)-**24****

Procedura ogólna

Do odpowiedniej pochodnej **176** (1.00 mmol) dodałam 15.00 ml 5M kwasu solnego. Zawartość kolby mieszałam w temperaturze wrzenia przez 6 godzin. Po zatężeniu rozpuszczalnika, mieszaninę reakcyjną zawiesiłam w mieszaninie woda-metanol. Następnie wkropiłam tlenek propylenu do uzyskania odczynu obojętnego. Po zatężeniu, mieszaninę zawiesiłam w 10 ml wody dejonizowanej. Kwasy (1*S,3R*)-**24** i (1*R,3S*)-**24** wytrąciłam z roztworu za pomocą metanolu, natomiast enancjomery (1*R,3R*)-**24** i (1*S,3S*)-**24** wytrąciłam za pomocą izopropanolu. Osady dwukrotnie przemyłam odpowiednim alkoholem, a pozostały rozpuszczalnik odparowałam, uzyskując białe osady.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.5.1. z 3-acetoksydifosfonianu (1*R,3S*)-**176** (0.053 g, 0.11 mmol) otrzymałam kwas difosfonowy (1*R,3S*)-**24** (0.016 g, 53%) jako białe ciało stałe.

Kwas (1*R*,3*S*)-(1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowy (1*R*,3*S*)-**24**

$T_{\text{top}} = >290^{\circ}\text{C}$.

$[\alpha]_D^{20} = +6.55$ (*c* 0.61, 5% NH_3).

IR (KBr): $\nu = 3390, 3241, 2960, 2932, 1651, 1519, 1454, 1167, 1081, 919, 809, 723 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O): $\delta = 3.94$ (ddd, 1H, $J = 3.4 \text{ Hz}$, $J = 7.3 \text{ Hz}$, $J = 10.6 \text{ Hz}$, *CHP*), 3.41 (ddd, 1H, $J = 4.4 \text{ Hz}$, $J = 9.6 \text{ Hz}$, $J = 13.7 \text{ Hz}$, *CHP*), 2.28 – 2.21 (m, 1H, $H_a\text{C}2$), 1.96 – 1.87 (m, 1H, $H_b\text{C}2$).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, D_2O): $\delta = 67.91$ (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 10.2 \text{ Hz}$, $^1J_{\text{PC}} = 156.1 \text{ Hz}$), 48.35 (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 13.4 \text{ Hz}$, $^1J_{\text{PC}} = 141.4 \text{ Hz}$), 30.02.

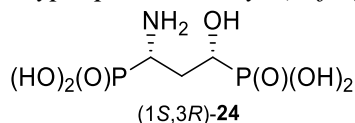
$^{31}\text{P NMR}$ (243 MHz, D_2O): $\delta = 17.88, 12.41$.

Analiza elementarna dla $\text{C}_3\text{H}_{11}\text{NO}_{11}\text{P}_2 \times 0.25 \text{ H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 15.04; H, 4.84; N, 5.85.

oznaczono: C, 15.07; H, 4.88; N, 5.89

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.5.1. z 3-acetoksydifosfonianu (1*S*,3*R*)-**176** (0.054 g, 0.11 mmol) otrzymałam kwas difosfonowy (1*S*,3*R*)-**24** (0.022 g, 86%) jako białe ciało stałe.

Kwas (1*S*,3*R*)-(1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowy (1*S*,3*R*)-**24**

$T_{\text{top}} = >290^{\circ}\text{C}$.

$[\alpha]_D^{20} = -4.64$ (*c* 0.56, 5% NH_3)

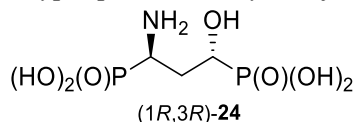
Analiza elementarna dla $\text{C}_3\text{H}_{11}\text{NO}_{11}\text{P}_2 \times 0.25 \text{ H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 15.04; H, 4.84; N, 5.85.

oznaczono: C, 15.12; H, 4.87; N, 5.84.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.5.1. z 3-acetoksydifosfonianu (1*R*,3*R*)-**176** (0.043 g, 0.09 mmol) otrzymałam kwas difosfonowy (1*R*,3*R*)-**24** (0.017 g, 84%) jako białe ciało stałe.

Kwas (1*R*,3*R*)-(1-amino-3-hydroksypropano-1,3-dylo)difosfonowy (1*R*,3*R*)-**24**



$T_{\text{top}} = >290^{\circ}\text{C}$.

$[\alpha]_D^{20} = -9.71$ (c 0.68, 5% NH_3).

IR (KBr): $\nu = 3406, 3252, 2960, 2936, 1636, 1532, 1438, 1165, 1062, 912, 717 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (600 MHz, D_2O): $\delta = 3.81$ (ddd, 1H, $J = 3.9 \text{ Hz}$, $J = 9.2 \text{ Hz}$, $J = 13.1 \text{ Hz}$, *CHP*), 3.43 (ddd, 1H, $J = 3.2 \text{ Hz}$, $J = 10.3 \text{ Hz}$, $J = 13.6 \text{ Hz}$, *CHP*), 2.18 – 2.10 (m, 1H, $H_a\text{C}2$), 2.08 – 2.00 (m, 1H, $H_b\text{C}2$).

^{13}C NMR (151 MHz, D_2O): $\delta = 65.45$ (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 11.2 \text{ Hz}$, $^1J_{\text{PC}} = 157.0 \text{ Hz}$), 46.53 (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 11.8 \text{ Hz}$, $^1J_{\text{PC}} = 142.2 \text{ Hz}$), 30.02.

^{31}P NMR (243 MHz, D_2O): $\delta = 18.29, 12.92$.

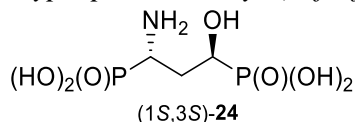
Analiza elementarna dla $\text{C}_3\text{H}_{11}\text{NO}_{11}\text{P}_2 \times 0.25 \text{ H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 15.04; H, 4.84; N, 5.85.

oznaczono: C, 15.12; H, 4.87; N, 5.84.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.5.1. z 3-acetoksydifosfonianu (1*S*,3*S*)-**176** (0.052 g, 0.11 mmol) otrzymałam kwas difosfonowy (1*S*,3*S*)-**24** (0.017 g, 69%) jako białe ciało stałe.

Kwas (1*S*,3*S*)-(1-amino-3-hydroksypropano-1,3-dylo)difosfonowy (1*S*,3*S*)-**24**



$T_{\text{top}} = >290^{\circ}\text{C}$.

$[\alpha]_D^{20} = +8.62$ (c 0.83, 5% NH_3).

Analiza elementarna dla $\text{C}_3\text{H}_{11}\text{NO}_{11}\text{P}_2 \times 0.25 \text{ H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 15.04; H, 4.84; N, 5.85.

oznaczono: C, 15.21; H, 4.85; N, 5.86.

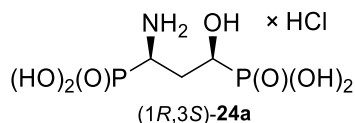
6.5.2. Synteza chlorowodorków kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych (1*R*,3*S*)-**24**, (1*S*,3*R*)-**24**, (1*R*,3*R*)-**24**, (1*S*,3*S*)-**24**

Procedura ogólna

Do odpowiedniej pochodnej (1*R*,3*S*)-, (1*S*,3*R*)-, (1*R*,3*R*)- lub (1*S*,3*S*)-**176** (1.00 mmol) dodałam 15.00 ml 5M kwasu solnego. Zawartość kolby mieszałam w temperaturze wrzenia przez 6 godzin. Po zatężeniu rozpuszczalnika, mieszaninę zawiesiłam w 10 ml wody dejonizowanej. Kwasy (1*S*,3*R*)-**24a** i (1*R*,3*S*)-**24a** wytrąciłam z roztworu za pomocą metanolu, natomiast enancjomery (1*R*,3*R*)-**24a** i (1*S*,3*S*)-**24a** wytrąciłam za pomocą izopropanolu. Osad dwukrotnie przemyłam odpowiednim alkoholem, a pozostały rozpuszczalnik odparowałam, uzyskując biały osad.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.5.2. z 3-acetoksydifosfonianu (1*R*,3*S*)-**176** (0.030 g, 0.06 mmol) otrzymałam chlorowoderek (1*R*,3*S*)-**24a** (0.014 g, 84%) jako białe ciało stałe.

*Chlorowoderek kwasu (1*R*,3*R*)-(1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowego (1*R*,3*S*)-**24a***



$T_{\text{top}} = >290^{\circ}\text{C}$.

IR (KBr): $\nu = 3401, 3239, 2961, 2932, 1650, 1518, 1453, 1166, 1079, 920, 811, 721 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (600 MHz, D₂O): $\delta = 4.01 - 3.86$ (m, 1H, *CHP*), $3.55 - 3.43$ (m, 1H, *CHP*), $2.22 - 2.01$ (m, 2H, *H₂C2*).

³¹P NMR (243 MHz, D₂O): $\delta = 20.44, 13.21$.

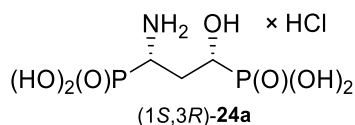
Analiza elementarna dla C₃H₁₁ClNO₁₂P₂:

obliczono: C, 13.27; H, 4.46; N, 5.16

oznaczono: C, 13.29; H, 4.69; N, 4.95

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.5.2. z 3-acetoksydifosfonianu (1*S*,3*R*)-**176** (0.020 g, 0.04 mmol) otrzymałam chlorowoderek (1*S*,3*R*)-**24a** (0.009 g, 79%) jako białe ciało stałe.

Chlorowodorek kwasu (1*S*,3*S*)-(1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowego (1*S*,3*R*)-**24a**



$T_{\text{top}} = >290^{\circ}\text{C}$.

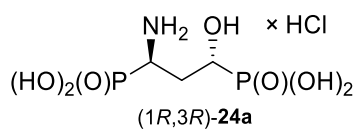
Analiza elementarna dla $\text{C}_3\text{H}_{11}\text{ClNO}_{12}\text{P}_2 \times 0.25 \text{H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 13.06; H, 4.57; N, 5.08.

oznaczono: C, 13.01; H, 4.85; N, 5.07

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.5.2. z 3-acetoksydifosfonianu (1*R*,3*R*)-**176** (0.033 g, 0.07 mmol) otrzymałam chlorowodorek (1*R*,3*R*)-**24a** (0.015 g, 81%) jako białe ciało stałe.

Chlorowodorek kwasu (1*R*,3*S*)-(1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowego (1*R*,3*R*)-**24a**



$T_{\text{top}} = >290^{\circ}\text{C}$.

IR (KBr): $\nu = 3408, 3255, 2959, 2932, 1655, 1533, 1442, 1167, 1081, 915, 719 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O): $\delta = 4.03 - 3.89$ (m, 1H, *CHP*), 3.51 (ddd, $J = 2.6 \text{ Hz}$, $J = 10.0 \text{ Hz}$, $J = 13.6 \text{ Hz}$, 1H, *CHP*), 2.16 – 1.98 (m, 2H, H_2C_2).

$^{31}\text{P NMR}$ (243 MHz, D_2O): $\delta = 21.57, 14.04$.

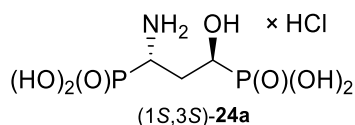
Analiza elementarna dla $\text{C}_3\text{H}_{11}\text{ClNO}_{12}\text{P}_2 \times 0.25 \text{H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 13.06; H, 4.57; N, 5.08.

oznaczono: C, 13.31 H, 4.81; N, 5.01.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.5.2. z 3-acetoksydifosfonianu (1*S*,3*S*)-**176** (0.038 g, 0.08 mmol) otrzymałam chlorowodorek (1*S*,3*S*)-**24a** (0.018 g, 84%) jako białe ciało stałe.

Chlorowodorek kwasu (1*S*,3*S*)-(1-amino-3-hydroksypropano-1,3-dylo)difosfonowego (1*S*,3*S*)-**24a**



$T_{\text{top}} = >290^{\circ}\text{C}$.

Analiza elementarna dla $\text{C}_3\text{H}_{11}\text{ClNO}_{12}\text{P}_2 \times 0.25 \text{H}_2\text{O}$:

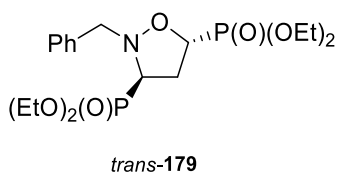
obliczono: C, 13.06; H, 4.57; N, 5.08.

oznaczono: C, 13.03; H, 4.63; N, 5.09.

6.6. Reakcja cykloaddykcji nitronu **178** do winylofosfonianu

W kolbie umieściłam nitron **178** (0.710 g, 2.62 mmol) i winylofosfonian dietylu (0.389 ml, 2.62 mmol) rozpuszczone w 3 ml toluenu. Zawartość kolby mieszałam przez 48 godzin w temperaturze 60°C na mieszadle magnetycznym. Po upływie tego czasu rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a surową mieszaninę poreakcyjną zawierającą diastereoizomeryczne izoksazolidyny *trans*-**179** i *trans*-**180** rozdzieliłam za pomocą chromatografii kolumnowej stosując jako układ rozwijający mieszaninę chloroform-izopropanol (100 : 1, 50 : 1, v/v) otrzymując izomer *trans*-**179** (0.331 g, 29%) w postaci bezbarwnego oleju. Pozostałość została rozdzielona za pomocą HPLC stosując układ woda-izopropanol (80 : 20, v/v) z przepływem 17 ml/min wydzieliłam izomer *trans*-**180** (0.040 g, 3.5%) jako bezbarwny olej.

(3*R*/*S*,5*R*/*S*)-(2-benzyloizoksazolidyno-3,5-dylo)difosfonian tetraetylu *trans*-**179**



$R_f = 0.66$ (chloroform-izopropanol, 10 : 1, v/v).

IR (film): $\nu = 3477, 2984, 2931, 2911, 1650, 1246, 1048, 1025, 970 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.41$ (d, 2H, $J = 7.3 \text{ Hz}$, H_{Ar}), 7.32 (t, 2H, $J = 7.4 \text{ Hz}$, H_{Ar}), 7.28 (d, 1H, $J = 7.8 \text{ Hz}$, H_{Ar}), 4.73 (d, 1H, $J = 13.8 \text{ Hz}$, $H_{\text{a}}\text{CH}_b\text{Ph}$), 4.29 (dt, 1H, $J = 2.1 \text{ Hz}$, $J = 8.3 \text{ Hz}$, HC5), $4.25 - 4.08$ (m, 3H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$, $H_b\text{CH}_a\text{Ph}$), 3.46 (ddd, 1H, $J = 4.9 \text{ Hz}$, $J = 6.4$, $J = 8.3 \text{ Hz}$, HC3), $2.91 - 2.80$ (m, 2H, $H_a\text{C4}$, $H_b\text{C4}$), $1.38 - 1.31$ (m, 9H, $3 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 1.29 (t, 3H, $J = 7.1 \text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) $\delta = 136.85, 129.34, 128.17, 127.37, 72.98$ (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 6.1$ Hz, $^1J_{\text{PC}} = 167.7$ Hz, C5), 63.28 (d, $J = 6.6$ Hz), 63.14 (d, $J = 6.5$ Hz), 62.91 (d, $J = 8.0$ Hz), 62.77 (d, $J = 6.9$ Hz), 62.47 (d, $J = 6.8$ Hz), 61.66 (d, $J = 5.8$ Hz), 61.09 (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 5.8$ Hz, $^1J_{\text{PC}} = 170.8$ Hz, C3), $33.31, 16.51, 16.46, 16.42, 16.38$.

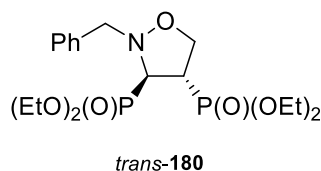
^{31}P NMR (243 MHz; CDCl_3): $\delta = 21.32, 20.77$.

Analiza elementarna dla $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_7\text{P}_2 \times 0.25 \text{H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 49.15; H, 7.22; N, 3.19.

oznaczono: C, 49.06; H, 7.07; N, 3.27.

(3R/S,4R/S)-(2-benzylizoksazolidyno-3,4-diylo)difosfonian tetraetylu trans-180



tr = 14.13 (woda-izopropanol, 80 : 20, v/v).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.43$ (d, 2H, $J = 6.9$ Hz, H_{Ar}), 7.33 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, H_{Ar}), 7.28 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, H_{Ar}), 4.28 (ddd, 1H, $J = 7.0$ Hz, $J = 8.9$ Hz, $J = 15.1$ Hz, H_{aC5}), 4.23 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz, $H_{\text{aCH}_b\text{Ph}}$), $4.21 - 4.14$ (m, 8H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 4.08 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz, $H_b\text{CH}_a\text{Ph}$), $4.08 - 4.03$ (m, 1H, $H_b\text{C5}$), 3.59 (ddd, 1H, $J = 5.5$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 21.0$ Hz, HC3), $3.26 - 3.11$ (m, 1H, HC4), 1.36 (t, 6H, $J = 7.1$ Hz, $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 1.30 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 1.27 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 136.54, 129.46, 128.35, 127.60, 66.57, 63.24$ (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.0$ Hz), 63.15 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.6$ Hz), 62.72 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.6$ Hz), 62.45 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.6$ Hz), 61.37 (d, $J = 177.1$ Hz), 41.95 (d, $J = 147.1$ Hz), 16.64 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 3.6$ Hz), 16.57 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.2$ Hz).

^{31}P NMR (243 MHz, CDCl_3): $\delta = 27.42$ (d, $J_{\text{PCCP}} = 32.4$ Hz), 21.15 (d, $J_{\text{PCCP}} = 32.4$ Hz).

Analiza elementarna dla $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_7\text{P}_2$:

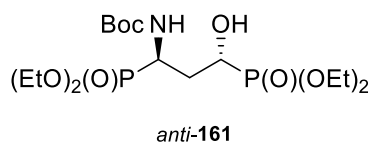
obliczono: C, 49.66; H, 7.18; N, 3.22.

oznaczono: C, 49.55; H, 7.02; N, 3.12.

6.6.1. Reakcja wodorolitycznego otwarcia izoksazolidyny *trans*-179

Synteza [1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-hydroksypropano-1,3-diylo]difosfonianu tetraetylu *anti*-161

Do roztworu racemicznej mieszaniny izoksazolidyny *trans*-179 (0.046 g, 0.02 mmol) rozpuszczonej w 0.5 ml etanolu w atmosferze gazu obojętnego (argonu) dodałam katalityczną ilość 20% PdOH/C (5 mg), przez chwilę przepuściłam strumień gazu obojętnego i rozpoczęłam wodorolizę dołączając balon wypełniony wodorem. Po upływie 48 godzin przez mieszaninę poreakcyjną przepuściłam strumień gazu obojętnego (argon) i przesączyłam ją przez Celit nasączony etanolem. Produkt oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej używając jako eluent mieszaniny chloroform-izopropanol (100 : 1, *v/v*) otrzymując związek *anti*-161 (0.032 g, 74%) jako bezbarwny olej.



R_f = 0.60 (chloroform-izopropanol, 10 : 1, *v/v*).

IR (film): $\nu = 3417, 3281, 2982, 2931, 1698, 1393, 1368, 1232, 1166, 1046, 1026 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (600 MHz; CDCl₃): $\delta = 5.00$ (dd, 1H, $J = 4.3 \text{ Hz}, J = 9.8 \text{ Hz}$, NH), 4.30 – 4.15 (m, 9H, 4 × CH₃CH₂OP, HC1), 4.10 (d, 1H, $J = 21.7 \text{ Hz}$, OH), 3.98 (dd, 1H, $J = 11.3 \text{ Hz}, J = 11.7 \text{ Hz}$, HC3), 2.23 – 2.15 (m, 1H, H_aC2), 2.01 – 1.98 (m, 1H, H_bC2), 1.47 (s, 9H, 3 × CH₃), 1.38 – 1.34 (m, 12H, 4 × CH₃CH₂OP).

¹³C NMR (151 MHz; CDCl₃): $\delta = 156.79$ (d, $^3J_{\text{CNCP}} = 9.0 \text{ Hz}$), 81.04, 63.80 (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 13.2 \text{ Hz}, ^1J_{\text{PC}} = 170.6 \text{ Hz}$), 63.02 (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.0 \text{ Hz}$), 62.79 (d, $^2J_{\text{COP}} = 2.2 \text{ Hz}$), 62.73 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.8 \text{ Hz}$), 43.66 (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 16.1 \text{ Hz}, ^1J_{\text{PC}} = 158.0 \text{ Hz}$), 32.72 (dd, $^2J_{\text{PCC}} = 4.0 \text{ Hz}, ^2J_{\text{PCC}} = 4.1 \text{ Hz}$), 28.20, 16.50 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 2.9 \text{ Hz}$), 16.46 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 2.9 \text{ Hz}$), 16.41 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.7 \text{ Hz}$), 16.34 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.7 \text{ Hz}$).

³¹P NMR (243 MHz, CDCl₃): $\delta = 24.59$ (d, $^4J_{\text{PCCC}} = 8.0 \text{ Hz}$), 24.93 (d, $^4J_{\text{PCCC}} = 8.0 \text{ Hz}$).

¹H NMR (600 MHz, C₆D₆): $\delta = 5.86$ (d, 1H, $J = 10.0 \text{ Hz}$, NH), 5.36 (s, 1H, OH), 4.75 (dtd, 1H, $J = 3.2 \text{ Hz}, J = 10.0 \text{ Hz}, J = 17.8 \text{ Hz}$, HC1), 4.41 (t, 1H, $J = 10.1 \text{ Hz}$, HC2), 4.19 – 4.04 (m, 4H, 2 × CH₃CH₂OP), 4.02 – 3.87 (m, 4H, 2 × CH₃CH₂OP), 2.64 – 2.53 (m, 1H, H_aC2), 2.42 – 2.33 (m, 1H, H_bC2), 1.37 (s, 9H, 3 × CH₃), 1.11 (t, 3H, $J = 7.1 \text{ Hz}$, CH₃CH₂OP), 1.10 (t, 3H, $J = 7.1 \text{ Hz}$, CH₃CH₂OP), 1.04 (t, 3H, $J = 7.1 \text{ Hz}$, CH₃CH₂OP), 1.03 (t, 3H, $J = 7.1 \text{ Hz}$, CH₃CH₂OP).

^{13}C NMR (151 MHz, C_6D_6): $\delta = 169.04, 156.28$ (d, $^3J_{\text{CNCP}} = 5.8$ Hz), 79.37, 64.45 (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 13.9$ Hz, $^1J_{\text{PC}} = 155.1$ Hz), 62.44 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.8$ Hz), 62.25 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.5$ Hz), 62.15 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.3$ Hz), 44.26 (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 15.7$ Hz, $^1J_{\text{PC}} = 156.1$), 32.48, 27.96. 16.22 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.3$ Hz), 16.08 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.2$ Hz), 15.99 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.7$ Hz).

^{31}P NMR (243 MHz, C_6D_6): $\delta = 25.33$ (d, $J_{\text{PCCC}} = 7.2$ Hz), 24.56 (d, $J_{\text{PCCC}} = 7.2$ Hz).

Analiza elementarna dla $\text{C}_{16}\text{H}_{35}\text{NO}_9\text{P}_2 \times 0.25 \text{H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 42.53; H, 7.92; N, 3.10.

oznaczono: C, 42.38; H, 8.11; N, 3.09.

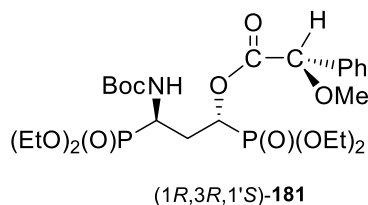
6.7. Synteza *O*-metylomigdałanów (*1R,3S,1'S*)-**181**, (*1R,3R,1'S*)-**181**, (*1S,3R,1'S*)-**181**, (*1S,3S,1'S*)-**181**

Procedura ogólna

Do roztworu 3-hydroksydifosfonianów *anti*-**161** (1.00 mmol) lub odpowiedniej mieszaniny (*1R,3S*)-**161** i (*1R,3R*)-**161** lub (*1S,3R*)-**161** i (*1S,3S*)-**161** (1.00 mmol) rozpuszczonych w 3.5 ml chlorku metylenu dodałam kwasu (*S*)-2-fenyl-2-metoksyoctowego (1.75 mmol), DCC (1.75 mmol) oraz DMAP (0.10 mmol). Zawartość kolby mieszałam w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie odsączyłam powstały w reakcji osad, a przesącz zatężyłam na wyparce. Diastereoizomery zostały wstępnie oczyszczone na żelu krzemionkowym w układzie chloroform-izopropanol (100 : 1 v/v), a następnie rozdzielone za pomocą HPLC.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.7. z racemicznej mieszaniny 3-hydroksydifosfonianów *anti*-**161** (0.134 g, 0.30 mmol) otrzymałam migdałany (*1R,3R,1'S*)-**181** (0.026g, 14%) oraz (*1S,3S,1'S*)-**181** (0.028 g, 10%) w postaci białych osadów.

(*1R,3R*)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-(*S*)-(2-metoksy-2-fenylacetoksy)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (*1R,3R,1'S*)-**181**



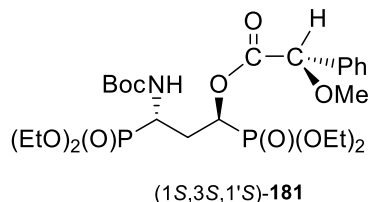
$t_{\text{R}} = 15.77$ min. (woda-acetonitryl, 63 : 37, v/v).

^1H NMR (600 MHz, C_6D_6): $\delta = 7.52$ (d, 2H, $J = 7.3$ Hz, H_{Ar}), 7.08 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H_{Ar}), 7.00 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, H_{Ar}), 6.05 (d, $J = 10.0$ Hz, NH), 5.84 (dddd, 1H, $J = 1.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.7$ Hz, $J = 9.7$ Hz, HC3), 4.88 (s, 1H, HCOCH₃), 4.58 (dddd, 1H, $J = 3.2$ Hz, $J = 7.7$ Hz, $J = 10.0$ Hz, $J = 9.7$ Hz, HC1), 4.09 – 3.97 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 3.95 – 3.84 (m, 2H, CH₃CH₂OP), 3.69 – 3.57 (m, 2H, CH₃CH₂OP), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 2.79 – 2.72 (m, 1H, $H_a\text{C}2$), 2.67 – 2.61 (m, 1H, $H_b\text{C}2$), 1.46 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1.11 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃CH₂OP), 1.07 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃CH₂OP), 0.93 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃CH₂OP), 0.89 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃CH₂OP).

^{31}P NMR (243 MHz, C_6D_6): $\delta = 24.72$ (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 7.9$ Hz), 19.18 (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 7.9$ Hz).

^{31}P NMR (243 MHz, CDCl_3): $\delta = 24.34$ (d, $J = 7.9$ Hz), 18.42 (d, $J = 7.9$ Hz).

(1*S*,3*S*)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-(*S*)-(2-metoksy-2-fenylacetoksy)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*S*,3*S*,1'*S*)-**181**



$t_{\text{R}} = 17.86$ min. (woda-acetonitryl, 63 : 37, v/v).

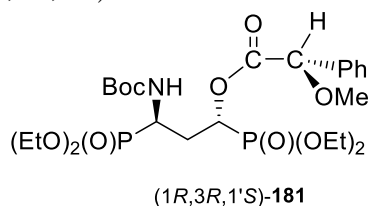
^1H NMR (C_6D_6 , 600 MHz): $\delta = 7.62$ (d, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, H_{Ar}), 7.17 – 7.15 (m, 2H, H_{Ar}), 7.05 (t, 1H, $^3J = 7.4$ Hz, H_{Ar}), 5.87 – 5.83 (m, 1H, HC3), 5.26 (d, $J = 10.4$ Hz, NH), 4.90 (s, 1H, HCOCH₃), 4.44 – 4.37 (m, 1H, HC1), 3.99 – 3.80 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 3.39 (s, 3H, OCH₃), 2.84 – 2.77 (m, 1H, $H_a\text{C}2$), 2.57 – 2.50 (m, 1H, $H_b\text{C}2$), 1.43 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1.03 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 0.97 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH₃CH₂OP), 0.91 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH₃CH₂OP).

^{31}P NMR (C_6D_6 , 243 MHz): $\delta = 24.31$ (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 7.5$ Hz), 19.72 (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 7.5$ Hz).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 243 MHz): $\delta = 23.98$ (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 7.6$ Hz), 19.34 (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 7.6$ Hz).

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.7. z mieszaniny 1:1 3-hydroksydifosfonianów (1*R*,3*R*)-**161** i (1*R*,3*S*)-**161** (0.262 g, 0.580 mmol) otrzymałam migdalany (1*R*,3*R*,1'*S*)-**181** (0.010 g, 3%) jako białe ciało stałe oraz (1*R*,3*S*,1'*S*)-**181** (0.028 g, 8%) w postaci bezbarwnego oleju.

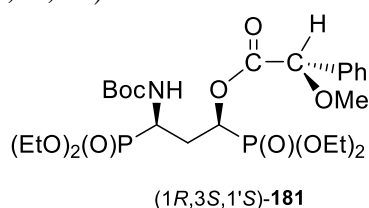
(1*R*,3*R*)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-(*S*)-(2-metoksy-2-fenyloacetoksy)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*R*,3*R*,1'*S*)-**181**



t_R = 12.56 min. (woda-acetonitryl, 61.5 : 38.5, v/v).

^{31}P NMR (243 MHz, CDCl_3): δ = 24.34 (d, J = 7.9 Hz), 18.42 (d, J = 7.9 Hz).

(1*R*,3*S*)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-(*S*)-(2-metoksy-2-fenyloacetoksy)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*R*,3*S*,1'*S*)-**181**



t_R = 14.12 min. (woda-acetonitryl, 61.5 : 38.5, v/v).

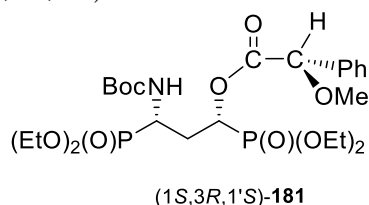
^1H NMR (600 MHz, C_6D_6): δ = 7.63 (d, 2H, J = 7.5 Hz, H_{Ar}), 7.18 – 7.17 (m, 2H, H_{Ar}), 7.05 (t, 1H, J = 7.4 Hz, H_{Ar}), 5.99 – 5.95 (m, 1H, H_{C3}), 5.32 (d, 1H, J = 8.6 Hz, NH), 4.83 (s, 1H, HCOCH_3), 4.53 (dq, 1H, J = 7.5 Hz, J = 16.6 Hz, H_{C1}), 4.02 – 3.86 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 3.28 (s, 3H, OCH_3), 2.85 – 2.74 (m, 1H, H_{aC2}), 2.30 – 2.17 (m, 1H, H_{bC2}), 1.41 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1.10 – 0.96 (m, 12H, $4 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$).

^{31}P NMR (243 MHz, C_6D_6): δ = 23.77, 19.72.

^{31}P NMR (243 MHz, CDCl_3): δ = 23.38, 19.14.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.7. z mieszaniny 1:1 3-hydroksydifosfonianów (1*S*,3*R*)-**161** i (1*S*,3*S*)-**161** (0.088 g, 0.20 mmol) otrzymałam migdałany (1*S*,3*R*,1'*S*)-**181** (0.036 g, 30%) jako bezbarwny olej oraz (1*S*,3*S*,1'*S*)-**181** (0.031 g, 26%) jako białe ciało stałe.

(1*S*,3*R*)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-(*S*)-(2-metoksy-2-fenyloacetoksy)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*S*,3*R*,1'*S*)-**181**



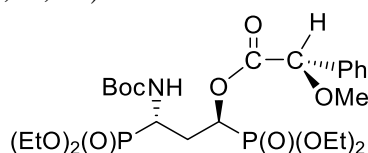
$t_R = 9.06$ (woda-acetonitryl, 60 : 40, v/v).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6): $\delta = 7.57$ (d, 2H, $J = 7.4$ Hz, H_{Ar}), 7.11 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, H_{Ar}), 7.02 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, H_{Ar}), 5.99 – 5.95 (m, 1H, $HC3$), 5.52 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz, NH), 4.91 (s, 1H, $HCOCH_3$), 4.68 – 4.55 (m, 1H, $HC1$), 4.03 – 3.94 (m, 4H, $2 \times CH_3CH_2OP$), 3.92 – 3.84 (m, 2H, CH_3CH_2OP), 3.81 – 3.75 (m, 1H, CH_3CH_2OP), 3.72 – 3.61 (m, 1H, CH_3CH_2OP), 3.38 (s, 3H, OCH_3), 2.91 – 2.79 (m, 1H, H_aC2), 2.40 – 2.25 (m, 1H, H_bC2), 1.41 (s, 9H, $3 \times CH_3$), 1.07 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3CH_2OP), 1.04 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3CH_2OP), 0.93 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, $2 \times CH_3CH_2OP$).

$^{31}\text{P NMR}$ (243 MHz, C_6D_6): $\delta = 24.00, 19.22$.

$^{31}\text{P NMR}$ (243 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.61, 18.42$.

(1*S*,3*S*)-[1-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-3-(*S*)-(2-metoksy-2-fenylacetoksy)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*S*,3*S*,1'*S*)-**181**



(1*S*,3*S*,1'*S*)-**181**

$t_R = 10.82$ min. (woda-acetonitryl, 60 : 40, v/v).

$^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3 , 243 MHz): $\delta = 23.98$ (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 7.6$ Hz), 19.34 (d, $^4J_{\text{PCCCP}} = 7.6$ Hz).

6.8. Synteza (3-benzyloamino-1-*tert*-butoksykarbonyloaminopropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu (1*R*,3*R*)-**162**, (1*R*,3*S*)-**162**, (1*S*,3*S*)-**162**, (1*S*,3*R*)-**162**

6.8.1. Synteza pochodnych **162** w reakcji Kabachnika-Fieldsa z aldehydu (*S*)-**163** lub (*R*)-**163**

Procedura ogólna

Do roztworu 1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylfosfonianu dietylu (*S*)-**163** lub (*R*)-**163** (1.00 mmol) w 1.27 ml trifluoroetanolu dodałam fosforynu trietylowego (1.20 mmol) oraz benzyloaminę (1.20 mmol). Zawartość kolby mieszałam w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po odparowaniu rozpuszczalnika surowe produkty oczyściłam na żelu krzemionkowym otrzymując mieszaniny diastereoizomerycznych związków (1*R*,3*S*)-**162** i (1*R*,3*R*)-**162** oraz (1*S*,3*R*)-**162** i (1*S*,3*S*)-**162**. Czyste diastereoizomery wydzieliłam za pomocą HPLC.

6.8.2. Synteza pochodnych **162** poprzez reakcję aza-Pudovika z iminy (*R*)-**184** lub (*S*)-**184**

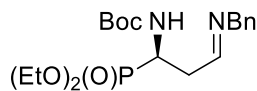
6.8.2.1. Addycja benzyloaminy do 1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonianu dietylu (*R*)-**163** lub (*S*)-**163**

Procedura ogólna

Do odpowiedniego 3-oksopropylofosfonianu dietylu (*R*)-**163** (1.00 mmol) lub (*S*)-**163** (1.00 mmol) w 3.5 ml chlorku metylenu dodałam benzyloaminy (1.20 mmol) oraz siarczanu(VI) magnezu. Zawartość kolby mieszałam przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po odsączeniu siarczanu(VI) magnezu, zateżyłam mieszaninę otrzymując surowe iminy (*R*)-**184** lub (*S*)-**184**, które bez oczyszczania zostały użyte do kolejnych reakcji.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.8.2.1. z 3-oksopropylofosfonianu dietylu (*R*)-**163** (0.068 g, 0.22 mmol) otrzymałam (*R*)-[3-benzylimino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propylo]fosfonian dietylu (*R*)-**184** (0.072 g, 82%) jako bezbarwny olej.

(R)-[3-Benzylimino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propylo]fosfonian dietylu (*R*)-**184**



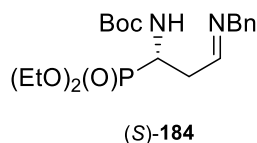
(R)-**184**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.85 – 7.81 (m, 1H, C(N)H), 7.41 – 7.32 (m, 5H, H_{Ar}), 4.95 (d, 1H, *J* = 10.5 Hz, NH), 4.60 (s, 2H, CH₂Ph), 4.41 (dtd, 1H, *J* = 4.1 Hz, *J* = 10.3 Hz, *J* = 17.0 Hz, HC1), 4.19 – 4.14 (m, 4H, 2 × CH₃CH₂OP), 2.92 – 2.82 (m, 1H, H_aC2), 2.71 – 2.58 (m, 1H, H_bC2), 1.45 (s, 9H, 3 × CH₃), 1.32 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃CH₂OP), 1.31 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃CH₂OP).

³¹P NMR (CDCl₃, 243 MHz): δ = 23.83.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.8.2.1. z 3-oksopropylofosfonianu dietylu (*S*)-**163** (0.071 g, 0.23 mmol) otrzymałam (*S*)-[3-benzylimino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propylo]fosfonian dietylu (*S*)-**184** (0.076 g, 83%) jako bezbarwny olej.

(*S*)-[3-Benzylimino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propylo]fosfonian dietylu (*S*)-**184**



6.8.2.2. Addycja fosforynu trietylowego do [3-(benzylimino)-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propylo]fosfonianu dietylu (*R*)-**184** lub (*S*)-**184**

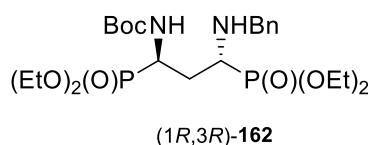
Procedura ogólna

Do roztworu zawierającego [3-benzylimino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propylo]fosfonianu dietylu (*R*)-**184** lub (*S*)-**184** (1.00 mmol) w 1.8 ml bezwodnego toluenu dodałam w atmosferze argonu kwasu trifluorocotowego (1.20 mmol) w 1.8 ml toluenu oraz fosforynu trietylowego (3.00 mmol) w 1.8 ml toluenu. Zawartość kolby mieszałam przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Surowe produkty oczyściłam na żelu krzemionkowym otrzymując mieszaninę diastereoizomerycznych związków (*1R,3S*)-**162** i (*1R,3R*)-**162** oraz (*1S,3R*)-**162** i (*1S,3R*)-**162**. Czyste diastereoizomery wydzieliłam za pomocą HPLC.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.8.1. z (*R*)-1-*tert*-butoksykarbonyloamino-3-oksopropylofosfonianu dietylu (*R*)-**163** (0.093 g, 0.30 mmol) otrzymałam diaminodifosfoniany (*1R,3R*)-**162** (0.033 g, 17%) i (*1R,3S*)-**162** (0.105 g, 53%) jako bezbarwne oleje.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.8.2.2. z (*R*)-[3-benzylimino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propylo]fosfonianu dietylu (*R*)-**184** (0.228 g, 0.57 mmol), otrzymałam diaminodifosfoniany (*1R,3R*)-**162** (0.069g, 22%) i (*1R,3S*)-**162** (0.173 g, 56%) jako bezbarwne oleje.

(*1R,3R*)-[3-Benzylamino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-dylo]difosfonian tetraetylu (*1R,3R*)-**162**



$t_R = 5.20$ min. (woda-acetonitryl, 65 : 45, v/v).

$[\alpha]_D^{20} = -0.65$ (c 1.53 CHCl_3).

IR (film): $\nu = 3583, 3447, 3256, 3029, 2932, 2909, 1711, 1049, 1028$ cm^{-1} .

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.37$ (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, H_{Ar}), 7.30 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.22 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz, H_{Ar}), 5.06 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz, NH), 4.32 (dtd, 1H, $J = 6.0$ Hz, $J = 8.9$ Hz, $J = 15.8$ Hz, $HC3$), $4.20 - 4.03$ (m, 8H, $4 \times CH_3CH_2OP$), 4.00 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, H_aCH_bPh), 3.88 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, H_bCH_aPh), 3.12 (dt, 1H, $J = 6.6$ Hz, $J = 13.6$ Hz, $HC1$), $2.36 - 2.28$ (m, 1H, H_aC2), $1.86 - 1.76$ (m, 1H, H_bC2), 1.40 (s, 9H, $3 \times CH_3$), 1.33 (t, 6H, $J = 7.1$ Hz, $2 \times CH_3CH_2OP$), 1.30 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, CH_3CH_2OP), 1.28 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3CH_2OP).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): $\delta = 155.14$ (d, $^3J_{CNCP} = 5.4$ Hz), 139.85, 128.45, 128.34, 127.08, 79.91, 62.71 (d, $^2J_{COP} = 7.0$ Hz), 62.37 (d, $^2J_{COP} = 6.6$ Hz), 62.25 (d, $^2J_{COP} = 7.1$ Hz), 62.11 (d, $^2J_{COP} = 7.2$ Hz), 52.08 (d, $^3J_{CNCP} = 4.9$ Hz), 51.51 (dd, $^1J_{PC} = 154.3$ Hz, $^3J_{PCCC} = 11.0$ Hz), 45.09 (dd, $^3J_{PCCC} = 11.3$ Hz, $^1J_{PC} = 156.4$ Hz), 31.30, 28.26, 16.55 (d, $^3J_{CCOP} = 5.3$ Hz), 16.52 (d, $^3J_{CCOP} = 5.3$ Hz), 16.45 (d, $^3J_{CCOP} = 5.7$ Hz), 16.33 (d, $^3J_{CCOP} = 6.0$ Hz).

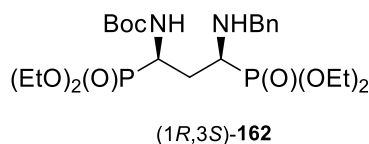
³¹P NMR (243 MHz, CDCl₃): $\delta = 27.25, 24.58$.

Analiza elementarna dla C₂₃H₄₂N₂O₈P₂ × 0.25 H₂O:

obliczono: C, 51.06; H, 7.92; N, 5.18.

oznaczono: C, 51.26; H, 8.04; N, 5.17.

(1R,3S)-[3-Benzylamino-1-(tert-butoksykarbonylamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (*1R,3S*)-**162**



tr = 6.92 min. (woda-acetonitryl, 65 : 45, v/v).

$[\alpha]_D^{20} = +31.92$ (c 1.04, CHCl₃).

IR (film): $\nu = 3583, 3444, 3256, 3029, 2980, 2909, 1711, 1049, 1028$ cm⁻¹.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.42$ (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, H_{Ar}), 7.31 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, H_{Ar}), 7.24 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, H_{Ar}), 5.30 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz, NH), $4.55 - 4.45$ (m, 1H, $HC1$), 4.15 (dtd, 8H, $J = 4.6$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 13.8$, $4 \times CH_3CH_2OP$), 4.08 (d, 1H, $J = 11.8$ Hz, H_aCH_bPh), 3.81 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, H_bCH_aPh), 3.23 (t, 1H, $J = 11.5$ Hz, $HC3$), $2.11 - 1.91$ (m, 2H, CH_2), 1.43 (s, 9H, $3 \times CH_3$), 1.33 (m, 12H, $4 \times CH_3CH_2OP$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 155.25, 128.67, 128.35, 127.12, 79.89, 62.73$ (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.1$ Hz), 62.41 (d, $^2J_{\text{COP}} = 6.8$ Hz), $62.12, 52.74, 51.46$ (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 11.8$ Hz, $^1J_{\text{PC}} = 145.6$), 44.20 (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 14.8$ Hz, $^1J_{\text{PC}} = 158.5$ Hz), $30.49, 28.30, 16.59$ (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.6$ Hz), 16.49 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.6$ Hz), 16.36 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.9$ Hz).

^{31}P NMR (243 MHz, CDCl_3): $\delta = 27.82$ (d, $J = 8.0$ Hz), 25.17 (d, $J = 8.0$ Hz).

Analiza elementarna dla $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_8\text{P}_2 \times 0.25 \text{H}_2\text{O}$:

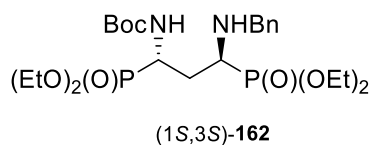
obliczono: C, 51.06; H, 7.92; N, 5.18.

oznaczono: C, 51.12; H, 8.07; N, 5.15.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.8.1. z (*S*)-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-oksopropylofosfonianu dietylu (*S*)-**163** (0.107 g, 0.35 mmol) otrzymałam diaminodifosfoniany (*1S,3S*)-**162** (0.033 g, 17%) oraz (*1S,3S*)-**162** (0.076 g, 41%).

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.8.2.2. z (*S*)-[3-benzylimino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propylo]fosfonianu dietylu (*R*)-**184** (0.175 g, 0.44 mmol) otrzymałam diaminodifosfoniany (*1R,3R*)-**162** (0.049g, 21%) i (*1R,3S*)-**162** (0.125 g, 53%) jako bezbarwne oleje.

(*1S,3S*)-[3-Benzylamino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-dylo]difosfonian tetraetylu (*1S,3S*)-**162**



$t_{\text{R}} = 7.53$ min. (woda-acetonitryl, 59 : 41, v/v).

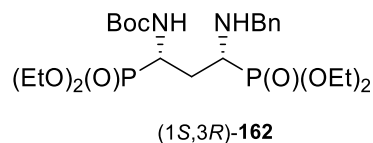
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2.84$ (c 0.81, CHCl_3).

Analiza elementarna dla $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_8\text{P}_2$:

obliczono: C, 51.49; H, 7.89; N, 5.22.

oznaczono: C, 51.33; H, 8.08, N, 5.12.

(1*S*,3*R*)-[3-Benzyloamino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*S*,3*R*)-**162**



$t_R = 10.21$ min. (woda-acetonitryl, 59 : 41, v/v).

$[\alpha]_D^{20} = -36.20$ (c 1.00, CHCl_3).

Analiza elementarna dla $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_8\text{P}_2 \times 0.25 \text{ H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 51.06; H, 7.92; N, 5.18.

oznaczono: C, 50.96; H, 8.06; N, 5.13.

6.9. Synteza [1,3-bis(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianu tetraetylu *mezo*-**183**, (1*R*,3*R*)-**183** oraz (1*S*,3*S*)-**183**

6.9.1. Procedura ogólna A

Do odpowiedniego [3-benzyloamino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianu tetraetylu (1*R*,3*S*)-**162** lub (1*S*,3*R*)-**162** (1.00 mmol) rozpuszczonego w 11.2 ml alkoholu etylowego dodałam diwęglanu di-*tert*-butylu (1.20 mmol) oraz katalityczną ilość 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (0.10 mmol). Przepuściłam strumień gazu obojętnego (argon), a następnie rozpoczęłam wodorolizę w reaktorze pod ciśnieniem 12 bar. Po 14 godzinach przez mieszaninę poreakcyjną przepuściłam strumień argonu, a następnie przesaczyłam przez warstwę Celitu nasączonego etanolem. Otrzymałam czyste [1,3-bis(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfoniany tetraetylu (1*R*,3*R*)-**183** i (1*S*,3*S*)-**183**.

6.9.2. Procedura ogólna B

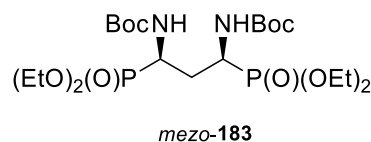
Do odpowiedniego [3-benzyloamino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*R*,3*R*)-**162** lub (1*S*,3*S*)-**162** (1.00 mmol) rozpuszczonego w 1.75 ml alkoholu etylowego dodałam diwęglanu di-*tert*-butylu (1.20 mmol) oraz katalityczną ilość 10% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (0.10 mmol). Przepuściłam strumień gazu obojętnego (argon), a następnie rozpoczęłam wodorolizę dołączając balon wypełniony wodorem. Po 24 godzinach przez mieszaninę poreakcyjną przepuściłam strumień argonu, a następnie przesaczyłam przez warstwę Celitu nasączonego etanolem. Otrzymałam czyste [1,3-bis(*tert*-

butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfoniany tetraetylu (1*R*,3*R*)-**183** lub (1*S*,3*S*)-**183**.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną A opisaną w rozdziale 6.9.1. z [3-benzyloamino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianu tetraetylu (1*R*,3*S*)-**162** (0.097 g, 0.18 mmol) otrzymałam [(1,3-bis-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu *mezo*-**183** (0.076 g, 77%).

Postępując zgodnie z procedurą ogólną A opisaną w rozdziale 6.9.1. z [3-benzyloamino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianu tetraetylu (1*S*,3*R*)-**162** (0.076 g, 0.14 mmol) otrzymałam [(1,3-bis-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu *mezo*-**183** (0.061 g, 79%) jako białe ciało stałe.

mezo-[(1,3-Bis(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu *mezo*-**183**



R_f = 0.51 (chloroform-izopropanol, 10 : 1, v/v).

T_{top} = 79 – 81°C.

IR (KBr): ν = 3334, 3258, 2980, 2931, 1708, 1692, 1172, 1025, 968, 802 cm⁻¹.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 4.72 (d, 2H, J = 10.5 Hz, 2 × NH), 4.25 – 4.18 (m, 2H, HC1, HC3), 4.14 – 4.07 (m, 8H, 4 × CH₃CH₂OP), 2.05 (dq, 2H, J = 6.0 Hz, J = 12.1 Hz, H_aC2, H_bC2), 1.39 (s, 18H, 6 × CH₃), 1.29 (t, 6H, J = 7.1 Hz, 2 × CH₃CH₂OP), 1.28 (t, 6H, J = 7.1 Hz, 2 × CH₃CH₂OP).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 154.74, 79.87, 62.65 (d, ²J_{COP} = 3.3 Hz), 62.60 (d, ²J_{COP} = 4.7 Hz), 42.95 (dd, ³J_{CCOP} = 13.3 Hz, ¹J_{PC} = 158.5 Hz), 29.10 (dd, ²J_{CCP} = 7.1 Hz, ²J_{CCP} = 7.1 Hz), 28.29, 16.46 (d, ³J_{CCOP} = 2.7 Hz), 16.44, (d, ³J_{CCOP} = 2.9 Hz), 16.33 (d, ³J_{CCOP} = 3.2 Hz), 16.31 (d, ³J_{CCOP} = 3.1 Hz).

³¹P NMR (243 MHz, CDCl₃): δ = 25.04.

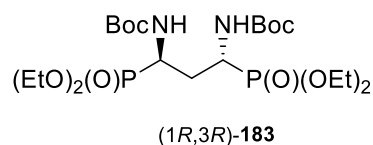
Analiza elementarna dla C₂₁H₄₄N₂O₁₀P₂:

obliczono: C, 46.16; H, 8.12; N, 5.13.

oznaczono: C, 45.93; H, 8.34; N, 5.03.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną B opisaną w rozdziale 6.9.2. z (1*R*,3*R*)-[3-benzyloamino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianu tetraetylu (1*R*,3*R*)-**162** (0.036 g, 0.07 mmol) otrzymałam [1,3-bis-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*R*,3*R*)-**183** (0.021 g, 57%) jako bezbarwny olej.

(1*R*,3*R*)-[1,3-Bis(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*R*,3*R*)-**183**



R_f = 0.52 (chloroform-izopropanol, 10 : 1, v/v).

$[\alpha]_D^{20} = -6.28$ (*c* 1.05, CHCl₃).

IR (film): $\nu = 3320, 3260, 2981, 2932, 1710, 1692, 1026 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.01$ (d, 2H, $J = 10.5 \text{ Hz}$, 2 × NH), 4.27 – 4.20 (m, 2H, HC1, HC3), 4.19 – 4.10 (m, 8H, 4 × CH₃CH₂OP), 2.44 – 2.35 (m, 1H, H_aC2), 1.95 – 1.80 (m, 1H, H_bC2), 1.46 (s, 18H, 6 × CH₃), 1.34 (t, 6H, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2 × CH₃CH₂OP), 1.33 (d, 6H, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2 × CH₃CH₂OP).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): $\delta = 155.03$ (d, $^3J_{\text{CNCP}} = 4.8 \text{ Hz}$), 79.98, 62.86 (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.0 \text{ Hz}$), 62.52 (d, $^2J_{\text{COP}} = 7.0 \text{ Hz}$), 44.45 (dd, $^3J_{\text{PCCC}} = 10.4 \text{ Hz}$, $^1J_{\text{PC}} = 156.3 \text{ Hz}$), 31.28 (dd, $^2J_{\text{PCC}} = 5.0 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{PCC}} = 5.0 \text{ Hz}$), 16.42 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.5 \text{ Hz}$), 16.33 (d, $^3J_{\text{CCOP}} = 5.8 \text{ Hz}$).

³¹P NMR (243 MHz, CDCl₃): $\delta = 24.38$.

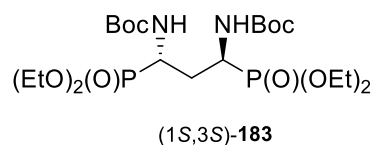
Analiza elementarna dla C₂₁H₄₄N₂O₁₀P₂:

obliczono: C, 46.16; H, 8.12; N, 5.13.

oznaczono: C, 45.88; H, 8.19; N, 4.96.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną B opisaną w rozdziale 6.9.2. z (1*S*,3*S*)-[3-benzyloamino-1-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianu tetraetylu (1*S*,3*S*)-**162** (0.043 g, 0.08 mmol) otrzymałam [1,3-bis-(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonian tetraetylu (1*S*,3*S*)-**183** (0.022 g, 50%) jako bezbarwny olej.

(1*S*,3*S*)-[(1,3-Bis(*tert*-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo)difosfonian tetraetylu
(1*S*,3*S*)-**183**



$[\alpha]_D^{20} = +6.18$ (*c* 1.10, CHCl₃).

Analiza elementarna dla C₂₁H₄₄N₂O₁₀P₂:

obliczono: C, 46.16; H, 8.12; N, 5.13.

oznaczono: C, 46.20; H, 8.42; N, 4.80.

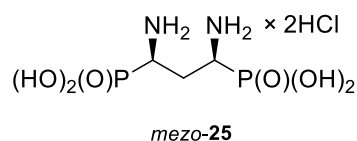
6.10. Synteza dichlorowodorków kwasów (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowych *mezo*-**25**, (1*R*,3*R*)-**25** oraz (1*S*,3*S*)-**25**

Procedura ogólna

Do odpowiedniej pochodnej **183** (1.00 mmol) dodałam 15.00 ml 5M kwasu solnego. Zawartość kolby mieszałam w temperaturze wrzenia przez 6 godzin. Po zateżeniu rozpuszczalnika, mieszaninę zawiesiłam w 10 ml wody dejonizowanej. Dichlorowodorki kwasów **25** wytrąciłam z roztworu za pomocą metanolu. Osady dwukrotnie przemyłam metanolem, a pozostały rozpuszczalnik odparowałam, uzyskując białe osady.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.10. z *mezo*-**183** (0.027 g, 0.05 mmol) otrzymałam dichlorowodorek (1*R*,3*R*)-**25** (0.021 g, 93%) jako białe ciało stałe.

Dichlorowodorek kwasu mezo-(1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowego *mezo*-**25**



$T_{\text{top}} = >290^\circ\text{C}$.

IR (KBr): $\nu = 3425, 2923, 2852, 1640, 1530, 1076 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (600 MHz, D₂O): $\delta = 3.37$ (dt, 2H, $J = 6.7 \text{ Hz}$, $J = 13.5 \text{ Hz}$, HC1, HC3), 2.23 (tt, 2H, $J = 6.5 \text{ Hz}$, $J = 12.6 \text{ Hz}$, H₂C2).

¹³C NMR (151 MHz, D₂O): $\delta = 47.57$ (dd, $^3J_{\text{PCC}} = 7.8 \text{ Hz}$, $^1J_{\text{PC}} = 141.2 \text{ Hz}$), 28.37.

^{31}P NMR (243 MHz, D_2O): $\delta = 12.10$.

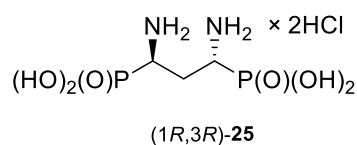
Analiza elementarna dla $\text{C}_3\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{P}_2$:

obliczono: C, 11.74; H, 4.60; N, 9.13.

oznaczono: C, 11.67; H, 4.73; N, 9.11

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.10. z (1*R*,3*R*)-**183** (0.020 g, 0.04 mmol) otrzymałam dichlorowodurek (1*R*,3*R*)-**25** (0.008 g, 73%) jako białe ciało stałe.

*Dichlorowodurek kwasu (1*R*,3*R*)-(1,3-diaminopropano-1,3-dylo)difosfonowego (1*R*,3*R*)-**25***



$[\alpha]_D^{20} = -18.57$ (*c* 0.42, 5% NH_3).

IR (KBr): $\nu = 3425, 2923, 2852, 1640, 1530, 1076 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (600 MHz, D_2O): $\delta = 3.54$ (dt, 2H, $J = 6.9 \text{ Hz}$, $J = 13.9 \text{ Hz}$, H_{C1} , H_{C3}), 2.42 (ddt, 1H, $J = 6.2 \text{ Hz}$, $J = 12.1 \text{ Hz}$, $J = 19.4 \text{ Hz}$, H_{aC2}), 2.19 (ddt, 1H, $J = 7.1 \text{ Hz}$, $J = 14.0 \text{ Hz}$, $J = 21.1 \text{ Hz}$, H_{bC2}).

^{13}C NMR (151 MHz, D_2O): $\delta = 45.67$ (dd, $^3J_{\text{PCC}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^1J_{\text{PC}} = 141.0 \text{ Hz}$), 27.85.

^{31}P NMR (243 MHz, D_2O): $\delta = 11.62$.

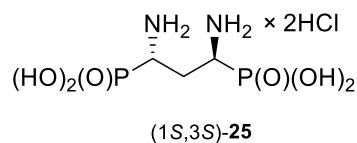
Analiza elementarna dla $\text{C}_3\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{P}_2 \times 0.25 \text{ H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 11.57; H, 4.69; N, 9.00.

oznaczono: C, 11.46; H, 4.99; N, 9.01.

Postępując zgodnie z procedurą ogólną opisaną w rozdziale 6.10. z (1*S*,3*S*)-**183** (0.027 g, 0.05 mmol) otrzymałam dichlorowodurek (1*S*,3*S*)-**25** (0.012 g, 80%) jako białe ciało stałe.

Dichlorowodorek kwasu (1*S*,3*S*)-(1,3-diaminopropano-1,3-dylo)difosfonowego (1*S*,3*S*)-**25**



$T_{\text{top}} = >290^{\circ}\text{C}$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20.50$ (c 0.40, 5% NH_3).

Analiza elementarna dla $\text{C}_3\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{P}_2 \times 0.25 \text{ H}_2\text{O}$:

obliczono: C, 11.57; H, 4.69; N, 9.00.

oznaczono: C, 11.47 H, 4.97; N, 9.03.

6.11. Ocena aktywności biologicznej

6.11.1. Przygotowanie próbek

Do eksperymentu, jako związek referencyjny wykorzystano syntetyczny LAP4, który jest selektywnym agonistą III grupy receptorów metabotropowych. LAP4 oraz badane związki (1*R*,3*R*)-**24a**, (1*R*,3*S*)-**24a**, (1*S*,3*S*)-**24a**, (1*S*,3*R*)-**24a**, (1*R*,3*R*)-**25**, (1*S*,3*S*)-**25** oraz *mezo*-**25** zostały zawieszono w buforze Hanks-HEPES, a następnie rozcieńczone do końcowej obliczonej objętości za pomocą roztworu wodorotlenku sodu w stężeniu 100 $\mu\text{mol/l}$. Do zbadania aktywności związków w kierunku własności agonistycznych wykorzystano stężenia 10 $\mu\text{mol/l}$ wobec receptorów mGluR₅ i mGluR₈ oraz 100 $\mu\text{mol/l}$ w przypadku mGluR₇. Związki w trakcie rozpuszczania były sonikowane w temperaturze nie przekraczającej 40°C.

6.11.2. Przygotowanie linii komórkowej

Do ekspresji białek wykorzystano linię komórkową Hek293 Tet-on z ekspresją receptorów metabotropowych: mGluR₅, mGluR₇ i mGluR₈ stymulowaną za pomocą tetracykliny. Hodowlę linii komórkowej prowadzono w warunkach standardowych (37°C, 5% CO_2) w roztworze DMEM (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium*) zawierającym 10% surowicę FBS (*ang. Fetal Bovine Serum*). Komórki poddano selekcji antybiotykowej. W trakcie eksperymentu komórki zawieszono w buforze Hanks-HEPES, które inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C. Aktywność receptorów sprawdzano poprzez indukowaną forskoliną akumulację cAMP w liniach komórkowych. Poziom cAMP był mierzony z wykorzystaniem zestawu dynamic 2 (CisBio, Codolet, Francja). Pomiar absorbancji wykonywano przy użyciu czytnika Infinite M1000 (TECAN Mannedorf,

Szwajcaria). Sygnał mierzono jako stosunek długości fal 655 nm do 620 nm. Wykryte sygnały były odwrotnie proporcjonalne do stężenia cAMP w próbkach.

7. LITERATURA CYTOWANA

7. LITERATURA CYTOWANA

- 1 Berlicki, L. & Kafarski, P. Computer-aided analysis and design of phosphonic and phosphinic enzyme inhibitors as potential drugs and agrochemicals. *Curr. Org. Chem.* **9**, 1829-1850 (2005). <https://doi.org/10.2174/138527205774913088>
- 2 Sienczyk, M. *et al.* Simple phosphonic inhibitors of human neutrophil elastase. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **21**, 1310-1314 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.01.083>
- 3 Vassiliou, S. *et al.* Structure-Guided, Single-Point Modifications in the Phosphinic Dipeptide Structure Yield Highly Potent and Selective Inhibitors of Neutral Aminopeptidases. *J. Med. Chem.* **57**, 8140-8151 (2014). <https://doi.org/10.1021/jm501071f>
- 4 Arya, T. *et al.* Identification of the Molecular Basis of Inhibitor Selectivity between the Human and Streptococcal Type I Methionine Aminopeptidases. *J. Med.Chem.* **58**, 2350-2357 (2015). <https://doi.org/10.1021/jm501790e>
- 5 Horiguchi, M. & Kandatsu, M. Isolation of 2-aminoethane phosphonic acid from rumen protozoa. *Nature* **184**, 901-902 (1959). <https://doi.org/10.1038/184901b0>
- 6 Rawls, R. Herbicide thwarts growth of malarial parasite. *Chem. Eng. News* **76**, 13-14 (1998). <https://doi.org/10.1021/cen-v076n026.p013b>
- 7 Roberts, F. *et al.* Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* **393**, 801-805 (1998). <https://doi.org/10.1038/31723>
- 8 Umezawa, H. Screening of small molecular microbial products modulating immune responses and bestatin. *Recent Results in Cancer Res.* **75**, 115-125 (1980). https://doi.org/10.1007/978-3-642-81491-4_19
- 9 Taylor, A., Daims, M., Lee, J. & Surgenor, T. Identification and quantification of leucine aminopeptidase in aged normal and cataractous human lenses and ability of bovine lens LAP to cleave bovine crystallins. *Curr. Eye Res.* **2**, 47-56 (1982). <https://doi.org/10.3109/02713688208998379>
- 10 Pulido-Cejudo, G., Conway, B., Proulx, P., Brown, R. & Izaguirre, C. A. Bestatin-mediated inhibition of leucine aminopeptidase may hinder HIV infection. *Antiviral Res.* **36**, 167-177 (1997). [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(97\)00052-1](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(97)00052-1)
- 11 Kuemin, M. & van der Donk, W. A. Structure-activity relationships of the phosphonate antibiotic dehydrophos. *ChemComm* **46**, 7694-7696 (2010). <https://doi.org/10.1039/c0cc02958k>
- 12 Solodenko, V. A. & Kukhar, V. P. Stereoselective papain-catalyzed synthesis of alafosfalin. *Tetrahedron Lett.* **30**, 6917-6918 (1989). [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)93388-x](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)93388-x)
- 13 Stamper, C. *et al.* Inhibition of the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* by L-leucinephosphonic acid. Spectroscopic and crystallographic characterization of the transition state of peptide hydrolysis. *Biochemistry* **40**, 7035-7046 (2001). <https://doi.org/10.1021/bi0100891>
- 14 Kafarski, P., Lejczak, B. & Szewczyk, J. Optically active 1-aminoalkanephosphonic acids. Dibenzoyl-L-tartaric anhydride as an effective agent for the resolution of racemic diphenyl 1-aminoalkanephosphonates. *Can. J. Chem.* **61**, 2425-2430 (1983). <https://doi.org/10.1139/v83-419>
- 15 Sheng, X. C. *et al.* Discovery of novel phosphonate derivatives as hepatitis C virus NS3 protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **19**, 3453-3457 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.05.023>
- 16 Deng, S. L. *et al.* Synthesis of ursolic phosphonate derivatives as potential Anti-HIV agents. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **182**, 951-967 (2007). <https://doi.org/10.1080/10426500601088838>
- 17 Aita, S. *et al.* Novel alpha-Aminophosphonates of imatinib Intermediate: Synthesis, anticancer Activity, human Abl tyrosine kinase Inhibition, ADME and toxicity prediction. *Bioorg. Chem.* **109** (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104718>

- 18 Kondo, Y. Studies on a new antibiotic SF-1293. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substance. *Sci. Reports of Meiji Seika Kaisha* **13**, 31-43 (1973).
- 19 Seto, H. *et al.* Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293). 2. Isolation of the first natural products with a C-P-H bond and their involvement in the C-P-C bond formation. *J. Antibiot* **36**, 96-98 (1983). <https://doi.org/10.7164/antibiotics.36.96>
- 20 Bayer, E. *et al.* Metabolites of microorganisms. Phosphinothricin and phosphinothricyl-alanylalanine. *Helv. Chim. Acta* **55**, 224-239 (1972). <https://doi.org/10.1002/hlca.19720550126>
- 21 Thomsen, C. The L-AP4 receptor. *Gen. Pharmac.* **29**, 151-158 (1997). [https://doi.org/10.1016/s0306-3623\(96\)00417-x](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(96)00417-x)
- 22 Selvam, C., Goudet, C., Oueslati, N., Pin, J. P. & Acher, F. C. L-(+)-2-amino-4-thiophosphonobutyric acid (L-thioAP4), a new potent agonist of group III metabotropic glutamate receptors: Increased distal acidity affords enhanced potency. *J. Med. Chem.* **50**, 4656-4664 (2007). <https://doi.org/10.1021/jm070400y>
- 23 Meldrum, B. S. *et al.* A comparison of the anticonvulsant potency of (\pm) 2-amino-5-phosphonopentanoic acid and (\pm) 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. *Neuroscience* **9**, 925-930 (1983). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90281-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90281-6)
- 24 Stone, T. W., Perkins, M. N., Collins, J. F. & Curry, K. Activity of the enantiomers of 2-amino-5-phosphono-valeric acid as stereospecific antagonists of excitatory aminoacids. *Neuroscience* **6**, 2249-2252 (1981). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90013-0)
- 25 France, C. P., Winger, G. D. & Woods, J. H. Analgesic, anesthetic, and respiratory effects of the competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist CGS 19755 in rhesus monkeys. *Brain Res.* **526**, 355-358 (1990). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91247-e](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91247-e)
- 26 Souza, R. O. O., Crispim, M., Silber, A. M. & Damasceno, F. S. Glutamine Analogues Impair Cell Proliferation, the Intracellular Cycle and Metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* **25** (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25071628>
- 27 Bessis, A. S., Bolte, J., Pin, J. P. & Acher, F. New probes of the agonist binding site of metabotropic glutamate receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 1569-1572 (2001). [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(01\)00158-5](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(01)00158-5)
- 28 Bunch, L. *et al.* 4,4-Dimethyl- and Diastereomeric 4-Hydroxy-4-methyl-(2S)-Glutamate Analogues Display Distinct Pharmacological Profiles at Ionotropic Glutamate Receptors and Excitatory Amino Acid Transporters. *Chemmedchem* **4**, 1925-1929 (2009). <https://doi.org/10.1002/cmcd.200900258>
- 29 Pin, J. P., De Colle, C., Bessis, A. S. & Acher, F. New perspectives for the development of selective metabotropic glutamate receptor ligands. *Eur. J. Pharmacol.* **375**, 277-294 (1999). [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00258-7](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00258-7)
- 30 Sanchez, C., Bogeso, K. P., Ebert, B., Reines, E. H. & Braestrup, C. Escitalopram versus citalopram: the surprising role of the R-enantiomer. *Psychopharmacology* **174**, 163-176 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1865-z>
- 31 Barbanj, M. J., Antonijoan, R. M. & Gich, I. Clinical pharmacokinetics of dexketoprofen. *Clin. Pharmacokinet.* **40**, 245-262 (2001). <https://doi.org/10.2165/00003088-200140040-00002>
- 32 Stoschitzky, K., Lindner, W. & Kiowski, W. Stereoselective vascular effects of the (R)-enantiomers and (S)-enantiomers of propranolol and atenolol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **25**, 268-272 (1995). <https://doi.org/10.1097/00005344-199502000-00012>
- 33 Fahn, S. The Medical Treatment of Parkinson Disease from James Parkinson to George Cotzias. *Mov. Disord.* **30**, 4-18 (2015). <https://doi.org/10.1002/mds.26102>
- 34 Cue, B. W. & Zhang, J. Green process chemistry in the pharmaceutical industry. *Green Chem. Lett. Rev.* **2**, 193-211 (2009). <https://doi.org/10.1080/17518250903258150>
- 35 Drauz, K. *et al.* in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Wiley-VCH, 2007).
- 36 Rodwell, V. W. in *Harper's Biochemistry* (eds. Robert K Murray, Daryl K Granner, Peter A Mayes, & Victor W Rodwell) 386-401 (The McGraw-Hill Companies, 2003).

- 37 Livingston, R. B., Venditti, J. M., Cooney, D. A. & Carter, S. K. Glutamine antagonists in chemotherapy. *Adv. Pharmacol. Chemother.* **8**, 57-120 (1970). [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60594-3](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60594-3)
- 38 Lee, H. G. *et al.* The role of metabotropic glutamate receptors in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* **64**, 89-98 (2004).
- 39 Fan, M. M. & Raymond, L. A. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* **81**, 272-293 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.11.003>
- 40 Crupi, R., Impellizzeri, D. & Cuzzocrea, S. Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* **12** (2019). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00020>
- 41 Duty, S. Therapeutic potential of targeting group III metabotropic glutamate receptors in the treatment of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 271-287 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00882.x>
- 42 Akins, P. T. & Atkinson, R. P. Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischaemic stroke. *Curr. Med. Res. Opin.* **18**, 9-13 (2002). <https://doi.org/10.1185/030079902125000660>
- 43 Sierra-Paredes, G. & Sierra-Marcuno, G. Extrasynaptic GABA and glutamate receptors in epilepsy. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **6**, 288-300 (2007). <https://doi.org/10.2174/187152707781387251>
- 44 Kew, J. N. C. & Kemp, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* **179**, 4-29 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2200-z>
- 45 Schoepp, D. D., Jane, D. E. & Monn, J. A. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **38**, 1431-1476 (1999). [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(99\)00092-1](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(99)00092-1)
- 46 Lebelt, L., Głowacka, I. E. & Piotrowska, D. G. (Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź, 2021).
- 47 Bell, E. A., Meier, L. K. & Sorensen, H. Hydroxylated glutamic acids in phlox, lepidium and rheum species. *Phytochemistry* **20**, 2213-2216 (1981). [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)80115-x](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)80115-x)
- 48 Schleifer, K. H., Plapp, R. & Kandler, O. Identification of threo-3-hydroxyglutamic acid in the cell wall of *Microbacterium lacticum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 566-570 (1967). [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(67\)90351-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(67)90351-8)
- 49 Pohanka, A., Menkis, A., Levenfors, J. & Broberg, A. Low-abundance kutznerides from *Kutzneria* sp 744. *J. Nat. Prod.* **69**, 1776-1781 (2006). <https://doi.org/10.1021/np0604331>
- 50 Shoji, J. & Sakazaki, R. A new peptide antibiotic complex s-520 .3. Isolation of L-threo-beta-hydroxyglutamic acid from hydrolysate. *J. Antibiot.* **23**, 418-419 (1970). <https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.418>
- 51 Shoji, J. & Sakazaki, R. A new peptide antibiotic complex s-520 .2. Further characterization and degradative studies. *J. Antibiot.* **23**, 432-436 (1970). <https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.432>
- 52 von Nussbaum, F. *et al.* Total synthesis and initial structure-activity relationships of longicatenamycin A. *Chemmedchem* **3**, 619-626 (2008). <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700297>
- 53 Broberg, A., Menkis, A. & Vasiliauskas, R. Kutznerides 1-4, depsipeptides from the actinomycete *Kutzneria* sp 744 inhabiting mycorrhizal roots of *Picea abies* seedlings. *J. Nat. Prod.* **69**, 97-102 (2006). <https://doi.org/10.1021/np050378g>
- 54 Strieker, M., Nolan, E. M., Walsh, C. T. & Marahiel, M. A. Stereospecific Synthesis of threo- and erythro-beta-Hydroxyglutamic Acid During Kutzneride Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13523-13530 (2009). <https://doi.org/10.1021/ja9054417>
- 55 Kaneko, T. & Yoshida, R. Optical resolution of β -hydroxyglutamic acid. Japan patent JP 36002174 B (1961).
- 56 Takemoto, T. & Nakajima, T. Isolation Of The Flycidal Constituent From *Tricholoma Muscarium*. *J. Pharm. Soc. Jpn.*, 1183-1186 (1964). https://doi.org/10.1248/yakushi1947.84.12_1183

- 57 Takemoto, T., Yokobe, T. & Nakajima, T. Isolation Of The Flycidal Constituent From Amanita Strobiliformis. **84**, 1186-1188 (1964). https://doi.org/10.1248/yakushi1947.84.12_1186
- 58 Lizarraga-Guerra, R. & Lopez, M. G. Content of free amino acids in huitlacoche (Ustilago maydis). *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2556-2559 (1996). <https://doi.org/10.1021/jf960017u>
- 59 Conti, P. *et al.* Synthesis and pharmacological characterization at glutamate receptors of erythro- and threo-tricholomic acid and homologues thereof. *Tetrahedron* **63**, 2249-2256 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.12.066>
- 60 Kaneko, T., Yoshida, R. & Katsura, H. On the Configuration of the Isomeric 3-Hydroxyglutamic Acid. *Nippon Kagaku Kaishi* **80**, 316-321 (1959). https://doi.org/10.1246/NIKKASHI1948.80.3_316
- 61 Garner, P. Stereocontrolled addition to a penaldic acid equivalent: an asymmetric of threo- β -hydroxy-L-glutamic acid. *Tetrahedron Lett.* **25**, 5855-5858 (1984). [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)81703-2](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)81703-2)
- 62 Tamborini, L. *et al.* Synthesis of new beta- and gamma-benzyloxy-S-glutamic acid derivatives and evaluation of their activity as inhibitors of excitatory amino acid transporters. *Tetrahedron* **65**, 6083-6089 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.05.054>
- 63 Blaskovich, M. A. & Lajoie, G. A. Synthesis of a chiral serine aldehyde equivalent and its conversion to chiral α -amino acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 5021-5030 (1993). <https://doi.org/10.1021/ja00065a010>
- 64 Roemmele, R. C. & Rapoport, H. Chiroselective synthesis of β -hydroxy- α -amino acids. *JOC* **54**, 1866-1875 (1989). <https://doi.org/10.1021/jo00269a023>
- 65 Dell'Uomo, N. *et al.* A Stereoselective Synthesis of threo-3-Hydroxyglutamic Acid. *Liebigs Ann. Chem.*, 641-644 (1994). <https://doi.org/10.1002/jlac.199419940618>
- 66 Kim, H., Yoo, D., Kwon, S. & Kim, Y. G. Efficient and stereoselective synthesis of threo-beta-hydroxy-L-glutamic acid via a tandem (Z)-olefination-conjugate addition. *Tetrahedron Asymm.* **20**, 2715-2719 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.11.023>
- 67 Park, C. S., Choi, H. G., Lee, H., Lee, W. K. & Ha, H. J. Stereoselective synthesis of protected threo-beta-hydroxy-L-glutamic acid using a chiral aziridine. *Tetrahedron Asymm.* **11**, 3283-3292 (2000). [https://doi.org/10.1016/s0957-4166\(00\)00311-6](https://doi.org/10.1016/s0957-4166(00)00311-6)
- 68 Veeresa, G. & Datta, A. Stereoselective synthesis of (2S, 3R)-N-Boc-3-hydroxyglutamic acid. *Tetrahedron Lett.* **39**, 3069-3070 (1998). [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(98\)00360-8](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(98)00360-8)
- 69 Kunieda, T., Ishizuka, T., Higuchi, T. & Hirobe, M. Versatile chiral synthons for vic-amino alcohols. Facile synthesis of (2S,3R)-3-hydroxyglutamic acid and (+)-statine. *J. Org. Chem.* **53**, 3381-3383 (1988). <https://doi.org/10.1021/jo00249a055>
- 70 Ishizuka, T., Ishibuchi, S. & Kunieda, T. Chiral synthons for 2-amino alcohols - facile preparation of optically-active amino hydroxy-acids of biological interest. *Tetrahedron* **49**, 1841-1852 (1993). [https://doi.org/10.1016/s0040-4020\(01\)80540-8](https://doi.org/10.1016/s0040-4020(01)80540-8)
- 71 Takahata, H., Takamatsu, T. & Yamazaki, T. Electrophilic olefin heterocyclization in organic synthesis. Stereoselective synthesis of 4,5-disubstituted γ -lactams by iodine-induced lactam formation of γ,δ -unsaturated thioimidates. *JOC* **54**, 4812-4822 (1989). <https://doi.org/10.1021/jo00281a022>
- 72 Takahata, H., Banba, Y., Tajima, M. & Momose, T. Asymmetric intramolecular amidation of N-(tert-butoxycarbonyl)-3-hydroxy-4-pentenylamine - a new entry to chiral building-blocks for the synthesis of biologically-active nitrogen-containing compounds. *JOC* **56**, 240-245 (1991). <https://doi.org/10.1021/jo00001a045>
- 73 Shiokawa, S., Ohta, T. & Nozoe, S. Synthesis of erythro-L- β -Hydroxyglutamic Acid Hydrochloride from L-Malic Acid. *Chem.Pharm. Bull.* **40**, 1398-1399 (1992).
- 74 Oba, M., Mita, A., Kondo, Y. & Nishiyama, K. Facile synthesis of 3-hydroxyglutamic acids via cyanation of chiral N-acyliminium cation derived from (S)-malic acid. *Synth. Commun.* **35**, 2961-2966 (2005). <https://doi.org/10.1080/00397910500278446>
- 75 Kumar, K. S. A., Rathee, J. S., Subramanian, M. & Chattopadhyay, S. Divergent Synthesis of 4-epi-Fagomine, 3,4-Dihydroxypipicolinic Acid, and a Dihydroxyindolizidine and Their beta-Galactosidase

- Inhibitory and Immunomodulatory Activities. *JOC* **78**, 7406-7413 (2013). <https://doi.org/10.1021/jo400448p>
- 76 Kumar, K. S. A. & Chattopadhyay, S. D-Glucose based syntheses of beta-hydroxy derivatives of L-glutamic acid, L-glutamine, L-proline and a dihydroxy pyrrolidine alkaloid. *Rsc Adv.* **5**, 19455-19464 (2015). <https://doi.org/10.1039/c5ra01340b>
- 77 Virtanen, A. I. & Hietala, P. K. γ -Hydroxyglutamic acid in green plants. *Acta Chem. Scand.* **9**, 175-176 (1955). <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.09-0175>
- 78 Benoiton, L., Winitz, M., Birnbaum, S. M. & Greenstein, J. P. Studies on diastereomeric α -amino acids and corresponding α -hydroxy acids. IX. Configuration of the isomeric γ -hydroxyglutamic acids. *J. Am. Soc. Chem.* **79**, 6192-6198 (1957). <https://doi.org/10.1021/ja01580a023>
- 79 Lee, Y. K. & Kaneko, T. Optical resolution and stereochemistry of γ -hydroxyglutamic acid. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **46**, 3494-3498 (1973). <https://doi.org/10.1246/bcsj.46.3494>
- 80 Hatanaka, S. gamma-Hydroxyglutaminsäure in *Linaria vulgaris* Miller. *Acta Chem. Scand.* **16**, 513-514 (1962). <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.16-0513>
- 81 Adams, E. & Goldstone, A. Hydroxyproline metabolism. IV. Enzymatic synthesis of gamma-hydroxyglutamate from Delta 1-pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate. *J. Biol. Chem.* **235**, 3504-3512 (1960).
- 82 Li, X. S., Knight, J., Lowther, W. T. & Holmes, R. P. Hydroxyproline metabolism in a mouse model of Primary Hyperoxaluria Type 3. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **1852**, 2700-2705 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.016>
- 83 Grove, M. D., Weisleder, D. & Daxenbich, M. Pinnatanine and oxypinnatanine, novel amino acid amides from *Staphylea pinnata* L. *Tetrahedron* **29**, 2715-2719 (1973). [https://doi.org/10.1016/s0040-4020\(01\)93391-5](https://doi.org/10.1016/s0040-4020(01)93391-5)
- 84 Ogawa, Y. & Konishi, T. N-Glycosides of Amino Acid Amides from *Hemerocallis fulva* var. *sempervirens*. *Chem. Pharm. Bull.* **57**, 1110-1112 (2009). <https://doi.org/10.1248/cpb.57.1110>
- 85 Ogawa, Y., Kawai, M., Kinoshita, A. & Konishi, T. Nitrogen-containing compounds from *Hemerocallis fulva* var. *sempervirens*. *Chem. Nat. Comp.* **49**, 991-995 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10600-014-0806-2>
- 86 Wood, J. M., Furkert, D. P. & Brimble, M. A. Total Synthesis and Stereochemical Revision of the 2-Formylpyrrole Alkaloid Hemerocallisamine I. *J. Nat. Prod.* **80**, 1926-1929 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00314>
- 87 Zhang, Y. J., Cichewicz, R. H. & Nair, M. G. Lipid peroxidation inhibitory compounds from daylily (*Hemerocallis fulva*) leaves. *Life Sci.* **75**, 753-763 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.03.002>
- 88 Lorenz, P., Stermitz, F. R. & Ismail, L. D. An amide of L-threo-gamma-hydroxyglutamic acid from *Justicia ghiesbreghtiana*. *Phytochemistry* **52**, 63-66 (1999). [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(99\)00172-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(99)00172-7)
- 89 Plaza, A., Viehig, K., Garcia, R. & Muller, R. Jahnellamides, alpha-Keto-beta-Methionine-Containing Peptides from the Terrestrial Myxobacterium *Jahnella* sp.: Structure and Biosynthesis. *Org. Lett.* **15**, 5882-5885 (2013). <https://doi.org/10.1021/ol402967y>
- 90 Ohyama, T. *et al.* Arborcandins A, B, C, D, E and F, novel 1,3-beta-glucan synthase inhibitors: Production and biological activity. *J. Antibiot.* **53**, 1108-1116 (2000). <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.1108>
- 91 Sugawara, T. *et al.* YM-170320, a novel lipopeptide antibiotic inducing morphological change of colonies in a mutant of *Candida tropicalis* pK233. *J. Antibiot.* **51**, 435-438 (1998). <https://doi.org/10.7164/antibiotics.51.435>
- 92 Zhao, X. L. *et al.* Predictive value of 4-Hydroxyglutamate and miR-149-5p on eclampsia. *Exp. Mol. Pathol.* **119** (2021). <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2021.104618>
- 93 Ogawa, Y., Uchiyama, N., Konishi, T. & Urade, Y. Oxypinnatanine promotes non-rapid eye movement sleep in mice. *Sleep and Biological Rhythms* **11**, 40-45 (2013). <https://doi.org/10.1111/sbr.12002>

- 94 Champoux, J. J. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369-413 (2001). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>
- 95 Suzuki, K., Yamaizumi, M., Tateishi, S., Monnai, Y. & Uyeda, M. Topostatin, a novel inhibitor of topoisomerases I and II produced by *Thermomonospora alba* strain no. 1520 - III. Inhibitory properties. *J. Antibiot.* **52**, 460-465 (1999). <https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.460>
- 96 Yamawaki, K., Sano, M. & Sato, J. Cephem Derivative Having Catechol Group (2013).
- 97 Sakai, R. *et al.* Pharmacological properties of the potent epileptogenic amino acid dysiherbaine, a novel glutamate receptor agonist isolated from the marine sponge *Dysidea herbacea*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 650-658 (2001).
- 98 Sakai, R., Kamiya, H., Murata, M. & Shimamoto, K. Dysiherbaine: A new neurotoxic amino acid from the Micronesian marine sponge *Dysidea herbacea*. *JACS* **119**, 4112-4116 (1997). <https://doi.org/10.1021/ja963953z>
- 99 Sakai, R. *et al.* Isolation, structure determination, and synthesis of neodysiherbaine A, a new excitatory amino acid from a marine sponge. *Org.Lett.* **3**, 1479-1482 (2001). <https://doi.org/10.1021/ol015798l>
- 100 Sasaki, M. *et al.* Rapid and efficient synthesis of dysiherbaine and analogues to explore structure - Activity relationships. *JOC* **73**, 264-273 (2008). <https://doi.org/10.1021/jo702116c>
- 101 Lash-Van Wyhe, L. L. *et al.* Pharmacological activity of C10-substituted analogs of the high-affinity kainate receptor agonist dysiherbaine. *Neuropharmacology* **58**, 640-649 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.11.013>
- 102 Zhou, Y. & Danbolt, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J. Neural. Transm.* **121**, 799-817 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>
- 103 Passerat, N. & Bolte, J. Large-scale enzymatic synthesis of diastereoisomeric gamma-hydroxy L-glutamic acids. *Tetrahedron Lett.* **28**, 1277-1280 (1987). [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(00\)95345-0](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)95345-0)
- 104 Ducrocq, C., Decottignieslemarechal, P. & Azerad, R. Synthesis of L-glutamic acid stereospecifically labeled at C-4 with deuterium. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **22**, 61-70 (1985). <https://doi.org/10.1002/jlcr.2580220109>
- 105 Guerard-Helaine, C. *et al.* Stereoselective synthesis of gamma-hydroxy-alpha-amino acids through aldolase-transaminase recycling cascades. *Chem. Comm.* **53**, 5465-5468 (2017). <https://doi.org/10.1039/c7cc00742f>
- 106 Hanessian, S. & Vanasse, B. Novel access to (3R)-3-hydroxy-L-aspartic acids, (4S)-4-hydroxy-L-glutamic acid, and related amino acids. *Can. J. Chem.* **71**, 1401-1406 (1993). <https://doi.org/10.1139/v93-181>
- 107 Kimber, M. C. & Moody, C. J. Construction of macrocyclic thiodipeptides: synthesis of a noniheptide 'southern hemisphere' model system. *Chem. Commun.*, 591-593 (2008). <https://doi.org/10.1039/b715644h>
- 108 Belhadj, T., Nowicki, A. & Moody, C. J. Synthesis of the 'Northern-Hemisphere' fragments of the thiopeptide antibiotic noniheptide. *Synlett*, 3033-3036 (2006). <https://doi.org/10.1055/s-2006-951502>
- 109 Krasnov, V. P., Bukrina, I. M., Zhdanova, E. A., Kodess, M. I. & Korolyova, M. A. Synthesis and Properties of 4-Haloglutamates. *Synthesis*, 961-964 (1994). <https://doi.org/10.1055/s-1994-25614>
- 110 Gefflaut, T., Bauer, U., Airola, K. & Koskinen, A. M. P. Asymmetric 1,3-dipolar cycloaddition: Synthesis of N-protected (4S)-4-hydroxy L-glutamic acid diester. *Tetrahedron Asymm.* **7**, 3099-3102 (1996). [https://doi.org/10.1016/0957-4166\(96\)00407-7](https://doi.org/10.1016/0957-4166(96)00407-7)
- 111 Kim, B. H. & Curran, D. P. Asymmetric thermal reactions with oppolzer's camphor sultam. *Tetrahedron* **49**, 293-318 (1993). [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)80300-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80300-8)
- 112 Ritter, A. R. & Miller, M. J. Amino Acid-Derived Chiral Acyl Nitroso Compounds: Diastereoselectivity in Intermolecular Hetero Diels-Alder Reactions. *JOC* **59**, 4602-4611 (1994). <https://doi.org/10.1021/jo00095a040>

- 113 Ritter, A. R. & Miller, M. J. Asymmetric syntheses of novel amino acids and peptides from acylnitroso-derived cycloadducts. *Tetrahedron Lett.* **35**, 9379-9382 (1994). [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(00\)78547-9](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)78547-9)
- 114 Zhang, X. J., Schmitt, A. C. & Jiang, W. A convenient and high yield method to prepare 4-hydroxypyroglutamic acids. *Tetrahedron Lett.* **42**, 5335-5338 (2001). [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)01030-9](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)01030-9)
- 115 Wojtas, K. P. *et al.* Total Synthesis of Nosiheptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 9772-9776 (2016). <https://doi.org/10.1002/anie.201603140>
- 116 Lu, J. Y., Riedrich, M., Wojtas, K. P. & Arndt, H. D. Assembly of the Nosiheptide A-Ring: A Fruitful Lesson. *Synthesis Stutt.* **45**, 1300-1311 (2013). <https://doi.org/10.1055/s-0032-1317810>
- 117 Ohta, T., Hosoi, A. & Nozoe, S. Stereoselective hydroxylation of N-carbamoyl-L-pyroglutamate. Synthesis of (-)-bulgecinine. *Tetrahedron Lett.* **29**, 329-332 (1988). [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(00\)80087-8](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)80087-8)
- 118 Avent, A. G., Bowler, A. N., Doyle, P. M., Marchand, C. M. & Young, D. W. Stereospecific synthesis of 4-fluoroglutamic acids. *Tetrahedron Lett.* **33**, 1509-1512 (1992). [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(00\)91661-7](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)91661-7)
- 119 Thomassigny, C., Le Bouc, G. & Greck, C. Asymmetric syntheses of functionalized pyrrolizidin-3-ones. *Arkivoc*, 231-249 (2012). <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0013.821>
- 120 Schwartz, D. *et al.* Biosynthetic Gene Cluster of the Herbicide Phosphinothricin Tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *AEM* **70**, 7093-7102 (2004). <https://doi.org/10.1128/aem.70.12.7093-7102.2004>
- 121 Bayer, E. *et al.* Metabolic products of microorganisms. 98. Phosphinothricin and phosphinothricylalanyl-analine. *Helv. Chim.* **55**, 224-239 (1972). <https://doi.org/10.1002/hlca.19720550126>
- 122 Pline, W. A., Lacy, G. H., Stromberg, V. & Hatzios, K. K. Antibacterial activity of the herbicide glufosinate on *Pseudomonas syringae* pathovar *glycinea*. *Pestic. Biochem. Phys.* **71**, 48-55 (2001). <https://doi.org/10.1006/pest.2001.2556>
- 123 Ahmad, I., Bissett, J. & Malloch, D. Influence of the bioherbicide phosphinothricin on interactions between phytopathogens and their antagonists. *Canad. J. Bot.* **73**, 1750-1760 (1995). <https://doi.org/10.1139/b95-187>
- 124 Wang, Y. X. *et al.* Glufosinate reduces fungal diseases in transgenic glufosinate-resistant bentgrasses (*Agrostis* spp.). *Weed Sci.* **51**, 130-137 (2003). [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2003\)051\[0130:grfdit\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2003)051[0130:grfdit]2.0.co;2)
- 125 Gregory, K. J. & Goudet, C. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CXI. Pharmacology, Signaling, and Physiology of Metabotropic Glutamate Receptors. *Pharmacol. Rev.* **73**, 521-569 (2021). <https://doi.org/10.1124/pr.119.019133>
- 126 Kroona, H. B., Peterson, N. L., Koerner, J. F. & Johnson, R. L. Synthesis of the 2-amino-4-phosphonobutanoic acid analogues (E)- and (Z)-2-amino-2,3-methano-4-phosphonobutanoic acid and their evaluation as inhibitors of hippocampal excitatory neurotransmission. *J. Med. Chem.* **34**, 1692-1699 (1991). <https://doi.org/10.1021/jm00109a023>
- 127 De Colle, C., Bessis, A. S., Bockaert, J., Acher, F. & Pin, J. P. Pharmacological characterization of the rat metabotropic glutamate receptor type 8a revealed strong similarities and slight differences with the type 4a receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **394**, 17-26 (2000). [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00113-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00113-8)
- 128 Cuomo, D. *et al.* Metabotropic glutamate receptor subtype 4 selectively modulates both glutamate and GABA transmission in the striatum: implications for Parkinson's disease treatment. *J. Neurochem.* **109**, 1096-1105 (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06036.x>
- 129 Beurrier, C. *et al.* Electrophysiological and behavioral evidence that modulation of metabotropic glutamate receptor 4 with a new agonist reverses experimental parkinsonism. *Faseb J.* **23**, 3619-3628 (2009). <https://doi.org/10.1096/fj.09-131789>

- 130 Acher, F. C., Selvam, C., Pin, J. P., Goudet, C. & Bertrand, H. O. A critical pocket close to the glutamate binding site of mGlu receptors opens new possibilities for agonist design. *Neuropharmacology* **60**, 102-107 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.07.002>
- 131 Selvam, C. *et al.* A Virtual Screening Hit Reveals New Possibilities for Developing Group III Metabotropic Glutamate Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **53**, 2797-2813 (2010). <https://doi.org/10.1021/jm901523t>
- 132 Amori, L. *et al.* Synthesis and preliminary biological evaluation of (2S,1'R,2'S)-and (2S,1S,2'R)-2-(2'-phosphonocyclopropyl)glycines, two novel conformationally constrained L-AP4 analogues. *Bioorg.Med.Chem. Lett.* **16**, 196-199 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.09.014>
- 133 Conn, P. J. & Pin, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 205-237 (1997). <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205>
- 134 Wright, R. A., Arnold, M. B., Wheeler, W. J., Ornstein, P. L. & Schoepp, D. D. Binding of H-3 (2S,1'S,2'S)-2-(9-xanthylmethyl)-2-(2'-carboxycyclopropyl) glycine (H-3 LY341495) to cell membranes expressing recombinant human group III metabotropic glutamate receptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **362**, 546-554 (2000). <https://doi.org/10.1007/s002100000305>
- 135 Cartmell, J. *et al.* Characterization of [3H]-(2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxy- cyclopropyl)glycine ([3H]-DCG IV) binding to metabotropic mGlu2 receptor-transfected cell membranes. *Br. J. Pharmacol.* **123**, 497-504 (1998). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701647>
- 136 Pin, J. P. & Acher, F. The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure, Activation Mechanism and Pharmacology. *CNS Neurol. Disord.-Drug Targets* **1**, 297-317 (2002). <https://doi.org/10.2174/1568007023339328>
- 137 Silvaggi, N. R., Anderson, J. W., Brinsmade, S. R., Pratt, R. F. & Kelly, J. A. The crystal structure of phosphonate-inhibited D-Ala-D-Ala peptidase reveals an analogue of a tetrahedral transition state. *Biochemistry* **42**, 1199-1208 (2003). <https://doi.org/10.1021/bi0268955>
- 138 Horsman, G. P. & Zechel, D. L. Phosphonate Biochemistry. *Chem. Rev.* **117**, 5704-5783 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00536>
- 139 Rigsby, R. E., Rife, C. L., Fillgrove, K. L., Newcomer, M. E. & Armstrong, R. N. Phosphonoformate: A minimal transition state analogue inhibitor of the fosfomycin resistance protein, FosA. *Biochemistry* **43**, 13666-13673 (2004). <https://doi.org/10.1021/bi048767h>
- 140 Hiratake, J. & Oda, J. Aminophosphonic and aminoboronic acids as key elements of a transition state analogue inhibitor of enzymes. *Biosci.* **61**, 211-218 (1997). <https://doi.org/10.1271/bbb.61.211>
- 141 Selvam, C. *et al.* Increased Potency and Selectivity for Group III Metabotropic Glutamate Receptor Agonists Binding at Dual sites. *J. Med. Chem.* **61**, 1969-1989 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01438>
- 142 Piotrowska, D. G. & Glowacka, I. E. Enantioselective synthesis of phosphonate analogues of (R)- and (S)-homoserine. *Tetrahedron Asym.* **18**, 2787-2790 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2007.11.007>
- 143 Tickell, D. A., Mahon, M. F., Bull, S. D. & James, T. D. A Simple Protocol for NMR Analysis of the Enantiomeric Purity of Chiral Hydroxylamines. *Org.Lett.* **15**, 860-863 (2013). <https://doi.org/10.1021/ol303566k>
- 144 Jeanmaire, T., Hervaud, Y. & Boutevin, B. Synthesis of dialkyl-hydroxymethylphosphonates in heterogeneous conditions. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **177**, 1137-1145 (2002). <https://doi.org/10.1080/10426500211718>
- 145 Gella, C. *et al.* A Metal-Free General Procedure for Oxidation of Secondary Amines to Nitrones. *JOC* **74**, 6365-6367 (2009). <https://doi.org/10.1021/jo901108u>
- 146 Ma, T. *et al.* Pentanidium-Catalyzed Enantioselective Phase-Transfer Conjugate Addition Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 2828-2831 (2011). <https://doi.org/10.1021/ja1098353>
- 147 Shioji, K., Takao, M. & Okuma, K. Convenient synthesis of linear spin traps containing diphenylphosphoryl groups. *Chem. Lett.* **35**, 1332-1333 (2006). <https://doi.org/10.1246/cl.2006.1332>

- 148 Piotrowska, D. G. & Glowacka, I. E. Enantiomerically pure phosphonate analogues of cis- and trans-4-hydroxyprolines. *Tetrahedron-Asymmetry* **18**, 1351-1363 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2007.06.006>
- 149 Abramov, V. S. O Vzaimodeistvii Dialkilkilfosforistykh Kislot S Aldegidami I Ketonami - Novyi Metod Polucheniya Efirov Alpha-Oksialkilkilfosfinovykh Kislot. *Zhurnal Obshchei Khimii* **22**, 647-652 (1952).
- 150 Wroblewski, A. E. & Piotrowska, D. G. Enantiomeric phosphonate analogs of the paclitaxel C-13 side chain. *Tetrahedron Asymm.* **10**, 2037-2043 (1999). [https://doi.org/10.1016/s0957-4166\(99\)00206-2](https://doi.org/10.1016/s0957-4166(99)00206-2)
- 151 Harada, N. HPLC Separation of Diastereomers: Chiral Molecular Tools Useful for the Preparation of Enantiopure Compounds and Simultaneous Determination of Their Absolute Configurations. *Molecules* **21** (2016). <https://doi.org/10.3390/molecules21101328>
- 152 Glinka, M., Nowak, P. & Kamiński, M. Wpływ rodzaju kwaśnego dodatku do eluentu oraz właściwości fazy stacjonarnej na rozdzielanie średnio i nisko hydrofobowych kwaśnych organicznych związków chemicznych w odwróconych układach faz kolumnowej elucyjnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej - RP HPLC. *Camera Separatoria* **9**, 106-130 (2017).
- 153 Waszkuc, W., Janecki, T. & Bodalski, R. A Convenient Synthesis of α -Hydroxyaldehydes and Hydroxymethyl Ketones. *Synthesis*, 1025-1027 (1984). <https://doi.org/10.1055/s-1984-31061>
- 154 Olah, G. A. & Wu, A. H. Preparation of 1,2-diketones from nonenolizable aliphatic and aromatic acyl chlorides with diethyl 1-alkyl(aryl)-1-(trimethylsiloxy)-methanephosphonates. *JOC* **56**, 902-904 (1991). <https://doi.org/10.1021/jo00002a085>
- 155 Greene, T., W. & Wuts, P., G. W. in *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* 533-646 (John Wiley & Sons, Inc., 2006).
- 156 Piotrowska, D. G., Halajewska-Wosik, A. & Wroblewski, A. E. Racemization-free recovery of alpha-hydroxyphosphonates from their carboxylic esters. *Synth. Commun.* **30**, 3935-3940 (2000). <https://doi.org/10.1080/00397910008086952>
- 157 Gama, S. R. *et al.* C-H Bond Cleavage Is Rate-Limiting for Oxidative C-P Bond Cleavage by the Mixed Valence Diiron-Dependent Oxygenase PhnZ. *Biochemistry* **58**, 5271-5280 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00145>
- 158 Nejman, M., Sliwiska, A. & Zwierzak, A. New access to racemic beta(3)-amino acids. *Tetrahedron* **61**, 8536-8541 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.04.077>
- 159 Piotrowska, D. G. Stereochemistry of substituted isoxazolidines derived from N-methyl C-diethoxyphosphorylated nitroene. *Tetrahedron* **62**, 12306-12317 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.10.011>
- 160 Piotrowska, D. G. N-substituted C-diethoxyphosphorylated nitrones as useful synthons for the synthesis of alpha-aminophosphonates. *Tetrahedron Lett.* **47**, 5363-5366 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.05.104>
- 161 Bonner, W. A. The Stereochemical Configurations Of The 1-C-Phenyl-D-Pentitols. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 3126-3132 (1951). <https://doi.org/10.1021/ja011151a038>
- 162 Hassner, A. & Alexanian, V. Direct Room-Temperature Esterification Of Carboxylic-Acids. *Tetrahedron Lett.* 4475-4478 (1978). [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95256-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95256-6)
- 163 Kozłowski, J. K., Rath, N. P. & Spilling, C. D. Determination of enantiomeric purity and absolute-configuration of alpha-hydroxyphosphonates. *Tetrahedron* **51**, 6385-6396 (1995). [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00308-u](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00308-u)
- 164 Ordonez, M., Rojas-Cabrera, H. & Catiuela, C. An overview of stereoselective synthesis of alpha-aminophosphonic acids and derivatives. *Tetrahedron* **65**, 17-49 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.09.083>
- 165 Ordonez, M., Viveros-Ceballos, J. L., Catiuela, C. & Sayago, F. J. An update on the stereoselective synthesis of alpha-aminophosphonic acids and derivatives. *Tetrahedron* **71**, 1745-1784 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.01.029>

- 166 Van Brabandt, W., Vanwalleghem, M., D'Hooghe, M. & De Kimpe, N. Asymmetric synthesis of 1-(2- and 3-haloalkyl)azetidin-2-ones as precursors for novel piperazine, morpholine, and 1,4-diazepane annulated beta-lactams. *JOC* **71**, 7083-7086 (2006). <https://doi.org/10.1021/jo0608319>
- 167 Metlushka, K. E. *et al.* 1-(alpha-Aminobenzyl)-2-naphthol: A New Chiral Auxiliary for the Synthesis of Enantiopure alpha-Aminophosphonic Acids. *Chem. Eur. J.* **15**, 6718-6722 (2009). <https://doi.org/10.1002/chem.200802540>
- 168 Smith, H. E. & Cooper, N. E. Ring-chain tautomerism of derivatives of 1-(alpha-aminobenzyl)-2-naphthol with aromatic aldehydes. *JOC* **35**, 2212-2215 (1970). <https://doi.org/10.1021/jo00832a023>
- 169 Keglevich, G., Balint, E., Kangyal, R., Balint, M. & Milen, M. A Critical Overview of the Kabachnik-Fields Reactions Utilizing Trialkyl Phosphites in Water as the Reaction Medium: A Study of the Benzaldehyde-Benzylamine Triethyl Phosphite/Diethyl Phosphite Models. *Heteroat. Chem.* **25**, 282-289 (2014). <https://doi.org/10.1002/hc.21192>
- 170 Vogel, A., I. *Preparatyka Organiczna.* (WNT, 1984).
- 171 Bochwic, B. *Preparatyka Organiczna.* (PWN, 1975).
- 172 Wróbel, T. *Preparatyka i elementy syntezy organicznej.* (PWN, 1983).
- 173 Tokuyama, H., Kuboyama, T., Amano, A., Yamashita, T. & Fukuyama, T. A novel transformation of primary amines to N-monoalkylhydroxylamines. *Synthesis*, 1299-1304 (2000). <https://doi.org/10.1055/s-2000-6428>

8. STRESZCZENIE

8. STRESZCZENIE

8.1. Streszczenie w języku polskim

Aktywność biologiczna związków posiadających w swoim szkielecie kwas L-glutaminowy była inspiracją do zaprojektowania nowych sfunkcjonalizowanych pochodnych posiadających w pozycji γ hydrofilową grupę hydroksylową lub aminową. W miejsce grup karboksylowych wprowadziłam ugrupowania fosfonowe $P(O)(OH)_2$, które mogą konkurować z substratem posiadającym grupę karboksylową o centrum aktywne enzymu lub innego komórkowego receptora. Wprowadzenie dodatkowych grup funkcyjnych, aminowych i hydroksylowych, może prowadzić do zmiany właściwości fizykochemicznych tych związków oraz spowodować istotne zmiany w sposobie oddziaływania z receptorami. Zsyntetyzowano wszystkie możliwe stereoizomery, cztery dla kwasu (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowego i trzy dla kwasu (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowego.

Prekursorem w syntezie enancjomerycznych kwasów difosfonowych były enancjomerycznie czyste (1-amino-3-oksopropyl)fosfoniany dietylu, które w reakcji Abramova z fosforynem dietylowym zostały przekształcone w izomeryczne (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfoniany tetraetylu, zaś w reakcji Kabachnika-Fieldsa z fosforynem trietylowym i benzyloaminą utworzyły (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfoniany tetraetylu. Otrzymane diastereoizomery zostały zhydrolizowane do odpowiednich kwasów difosfonowych. Enancjomerycznie czyste (1-amino-3-oksopropyl)fosfoniany dietylu otrzymano z (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu zgodnie z metodologią opracowaną wcześniej w naszym zespole. Opracowana została również alternatywna ścieżka syntezy (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu wykorzystująca utlenianie odpowiedniej aminy za pomocą oksonu.

Ustalenie konfiguracji absolutnej na C3 w estrach (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych oraz (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowych wymagało przekształcenia ich w odpowiednie pochodne zawierające wyselekcjonowane grupy ochronne, a następnie analizę widm odpowiednio ^{31}P NMR oraz 1H NMR.

Kwasy difosfonowe przebadano pod kątem aktywności agonistycznej wobec glutaminergicznych receptorów metabotropowych: mGluR₅, mGluR₇, i mGluR₈. Niestety przebadane związki nie wykazywały oczekiwanej aktywności agonistycznej.

8.2. Streszczenie w języku angielskim

The biological activity of L-glutamic acid derivatives has become an inspiration to design new compounds functionalized with a hydrophilic hydroxyl or amino group in the γ position. Phosphonic groups $P(O)(OH)_2$ have been introduced instead of the carboxyl functions. The phosphonic acid moiety may compete with a substrate having a carboxyl group for the active site of an enzyme or other cellular receptor. The introduction of additional amino and hydroxyl functional groups may change the physicochemical properties of these compounds and cause significant changes in the interaction with receptors. Since the designed compounds have two stereogenic centers, the synthesis of all possible stereoisomers should be considered, four enantiomers of (1-amino-3-hydroxypropane-1,3-diyl)diphosphonic acid and three enantiomers of (1,3-diaminopropane-1,3-diyl)diphosphonic acid.

The precursor for the synthesis of functionalized diphosphonic acids were enantiomerically pure tetraethyl (1-amino-3-oxopropyl)phosphonates, which have been converted into isomeric tetraethyl (1-amino-3-hydroxypropane-1,3-diyl)diphosphonates by Abramov's reaction with diethyl phosphite, and into tetraethyl (1,3-diaminopropane-1,3-diyl)diphosphonates by the Kabachnik-Fields reaction with triethyl phosphite and benzylamine. The obtained diastereoisomers of respective diphosphonates have been hydrolyzed to the corresponding diphosphonic acids. Enantiomerically pure tetraethyl (1-amino-3-oxopropyl)phosphonates have been obtained from (*S*)-*N*-(1-phenylethyl)-*C*-(diethoxyphosphoryl)nitrene according to the methodology previously developed in our research group. An alternative pathway for the synthesis of (*S*)-*N*-(1-phenylethyl)-*C*-(diethoxyphosphoryl)nitrene was developed using the oxidation of the appropriate amine with oxone.

Determination of the absolute configuration at C3 in (1-amino-3-hydroxypropane-1,3-diyl)diphosphonic esters and (1,3-diaminopropane-1,3-diyl)diphosphonic esters required their transformation into the respectively protected derivatives, and then analysis of ^{31}P NMR and 1H NMR spectra, respectively.

Diphosphonic acids were examined for agonist activity towards metabotropic glutamatergic receptors: mGluR₅, mGluR₇, and mGluR₈. None of the tested compounds showed expected agonist activity.

WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

➤ Publikacje bezpośrednio związane z tematem rozprawy doktorskiej

1. **Lebelt, L.**, Głowacka, I. E., Piotrowska, D. G. Synthesis of Four Enantiomers of (1-Amino-3-Hydroxypropane-1,3-Diyl)Diphosphonic Acid as Diphosphonate Analogues of 4-Hydroxyglutamic Acid. *Molecules* **27**, 2699, <https://doi.org/10.3390/molecules27092699> (2022).
IF: 4.927 (2022) MNiSW: 140
2. **Lebelt L.**, Głowacka I. E., Piotrowska D. G. Pochodne kwasu glutaminowego jako ligandy metabotropowych receptorów glutaminergicznych, *UMedical Reports*, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, [ISBN 978-83-963099-6-9](https://doi.org/10.3390/med202109042), 42 s (2021)
MNiSW: 80
3. Piotrowska, D. G., Głowacka, I. E., Wroblewski, A. E., **Lubowiecka, L.** Synthesis of nonracemic hydroxyglutamic acids. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **15**, 236-255, <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.22> (2019).
IF: 2.622 (2019) MNiSW: 70

➤ Pozostałe publikacje

1. Weremczuk-Jezyna, I., Hnatuszko-Konka, K., **Lebelt, L.**, Piotrowska, D. G., Grzegorzczuk-Karolak, I. The Effect of the Stress-signalling Mediator Triacontanol on Biochemical and Physiological Modifications in *Dracocephalum forrestii* Culture. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, <https://doi.org/10.3390/ijms232315147> (2022).
IF: 5.542 (2022) MNiSW: 140
2. Głowacka I.E., Grabkowska-Družyc M., **Lebelt L.**; Andrei G., Schols D., Snoeck R., Piotrowska D. G. β -Lactam analogs of oxetanocins – synthesis and biological activity. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **79**, 167-196, <https://doi.org/10.32383/appdr/149323> (2022).

IF: 0.33(2022) MNiSW: 100

3. Grzegorzczuk-Karolak, I., Staniewska, P., **Lebelt, L.**, Piotrowska, D. G. Optimization of cultivation conditions of *Salvia viridis* L. shoots in the Platform bioreactor to increase polyphenol production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02168-2> (2022).

IF: 2.711 (2022) MNiSW: 100

4. Weremczuk-Jeżyna, I., Hnatuszko-Konka, K., **Lebelt, L.**, Grzegorzczuk-Karolak, I. The Protective Function and Modification of Secondary Metabolite Accumulation in Response to Light Stress in *Dracocephalum forrestii* Shoots. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, <https://doi.org/10.3390/ijms22157965> (2021).

IF: 5.542 (2022) MNiSW: 140

5. Weremczuk-Jeżyna, I., **Lebelt L.**, Piotrowska, D. G, Gonciarz W., Chmiela, M., Grzegorzczuk-Karolak, I. The optimization growth *Dracocephalum forrestii* in RITA bioreactor, and preliminary screening of the biological activity of the polyphenol rich extract. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, (przyjęta 20.09.2022).

➤ Komunikaty konferencyjne

1. **Lebelt L.**, Głowacka I. E., Piotrowska D. G. „Synteza czterech enancjomerów kwasu (1-amino-3-hydroksypropan-1,3-diylo)difosfonowego jako difosfonowych analogów kwasu 4-hydroksylgutaminowego” IX Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii 19-20 czerwca 2022, Łódź.
2. Weremczuk-Jeżyna I., **Lebelt L.**, Gonciarz W. „Zawartość polifenoli oraz określenie aktywności cytotoksycznej ekstraktu z transformowanych pędów *dracocephalum forrestii*” XXIV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Salus aegroti suprema lex” 22-24 września 2021 Lublin.

3. Staniewska P., **Lebelt L.**, Grzegorzczak-Karolak I. „Optimization of secondary metabolites production in *Salvia viridis* L. shoots cultivated on a large scale in the Plantform bioreactor” 17th International and 59th Polish Conference Juvenes Pro Medicina 14 - 16 maja 2021, Łódź.
4. **Lubowiecka L.**, Głowacka I., Piotrowska D. „Fosfonianowe analogi kwasu glutaminowego” III Sympozjum "Szkoła Chemii Medycznej" 6-8 września 2017, Wrocław.

➤ Udział w projektach naukowo-badawczych

Wykonawca w projekcie NCN „beta-Laktamowe analogi przeciwwirusowych oksetanocyn”, kierownik projektu prof. Dorota G. Piotrowska.

➤ Inna działalność naukowa lub organizacyjna

Członek komitetu organizacyjnego 63 Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 2021, 13-09-2021-17-09-2021, Łódź.

➤ Nagrody rektora

1. Nagroda naukowa I stopnia za cykl publikacji pt. „Biologiczne aktywne aminokwasy i aminofosfoniany”. IF - 7,324 – 2020.
2. Nagroda naukowa I stopnia za cykl publikacji pt. „The effect of different light treatment on morphogenesis, secondary metabolite production and antioxidant potential of *Dracocephalum forrestii* shoots cultured in vitro”. IF - 13,022 – 2022.