

POLITECHNIKA ŚLĄSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY

KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ, BIOORGANICZNEJ
I BIOTECHNOLOGII

ROZPRAWA DOKTORSKA

*Synteza heterocyklicznych pochodnych
monosacharydów i ich wpływ na żywotność
komórek nowotworowych*

mgr inż. Katarzyna Żurawska

Promotor: prof. dr hab. inż. Krzysztof Walczak

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Kasprzycka

GLIWICE 2023

Podziękowania

*Chciałabym serdecznie podziękować
Pani dr inż. Annie Kasprzyckiej oraz panu prof. dr inż. Krzysztofowi Walczakowi
za opiekę merytoryczną i pomoc w napisaniu tejże pracy.
Panom dr Radosławowi Kitlowi oraz prof. dr inż. Wiesławowi Szei za ogrom rad,
niezbędnych do napisania tejże pracy.
Wszystkim koleżankom i kolegom w murach Centrum Biotechnologii,
szczególnie Pani dr inż. Katarzynie Papaj
za nieocenioną pomoc, wiele cennych rad i uśmiech na każdy dzień.
Mojej rodzinie za wsparcie i wiarę w moje możliwości.
Kochani, bez was ta praca nigdy by nie powstała.*

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Synteza heterocyklicznych pochodnych monosacharydów i ich wpływ na żywotność komórek nowotworowych

mgr inż. Katarzyna Żurawska

Promotor: prof. dr hab. inż. Krzysztof Walczak

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Kasprzycka

Zwiększająca się zapadalność na nowotwory sprawia, że konieczne jest poszukiwanie nowych terapeutyków, działających selektywnie na komórki zmienione chorobowo. Występowanie różnych rodzajów nowotworów i ich umiejscowienia w organizmie warunkuje posługiwanie się różnymi metodami leczenia. Oprócz operacyjnego usuwania guzów nowotworowych, stosuje się również m.in. chemioterapię, której celem mogą być receptory komórkowe i enzymy zaangażowane w procesy komórkowe, wpływające na przeżywalność komórek nowotworowych. Jednym z niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki enzymem jest fukozylotransferaza 8 (FUT8), enzym odpowiedzialny za przenoszenie reszty L-fukozy do akceptora molekularnego, którym może być inna cząsteczka cukrowa, lipidy lub białka. Nadekspresję FUT8 wykazano w komórkach wielu rodzajów nowotworów. Obecnie znanych jest niewiele efektywnych inhibitorów tego enzymu.

W pracy doktorskiej otrzymano szereg pochodnych związków heteroaromatycznych, ich glikozydów oraz glikokoniugatów, mogących pełnić funkcję inhibitorów FUT8. W trakcie badań otrzymano cukrowe półprodukty, pochodne głównie L-fukozy oraz L-ramnozy, oraz półprodukty niecukrowe, takie jak pochodne purpuryny, antrachinonu, 1,3,5-triazyny, 1,3,4-tiadiazolu, furan-2(5*H*)-onu, 2*H*-pirol-2-onu oraz 1,2,4-triazolu, które następnie zastosowano w syntezie złożonych pochodnych cukrowych, głównie L-ramnozy oraz L-fukozy.

Otrzymane połączenia poddano wstępnej ocenie ich aktywności biologicznej na liniach komórkowych HCT116 i MCF-7. Najniższe wartości IC₅₀ wobec badanych linii komórkowych uzyskano dla pochodnej **Ram38** (4-(3,4-dichloro-5-hydroksy-1*H*-pirol-2(5*H*)-on-1-ylometyleno)-1-(4-*O*-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozylo)-1*H*-1,2,3-triazol), dla której stwierdzono również oddziaływanie z FUT8 pochodzenia bakteryjnego.

Wyniki przeprowadzonych analiz pozwoliły na wstępne określenie struktury fragmentów z jakich powinien się składać potencjalny inhibitor oddziałujący z białkiem FUT8, co stanowi punkt wyjścia do dalszych badań w tym obszarze.

SUMMARY OF THE DOCTORAL DISSERTATION

Synthesis of heterocyclic monosaccharide derivatives and their effects on cancer cell viability

mgr inż. Katarzyna Żurawska

Supervisor: prof. dr hab. inż. Krzysztof Walczak

Assistant Supervisor: dr inż. Anna Kasprzycka

The increasing occurrence of cancer makes it necessary to search for new therapeutics that act selectively on the affected cells. The diverse types of cancer and their location in the body determine the use of different treatment methods. In addition to surgical removal of cancerous tumours, chemotherapy is used, which can target cell receptors and enzymes involved in cellular processes that affect the survival of cancer cells. Among the enzymes essential for normal cell function is fucosyltransferase 8 (FUT8), an enzyme responsible for transferring the L-fucose moiety to molecular acceptor, which can be another sugar molecule, lipids, or proteins. Overexpression of FUT8 has been indicated in several types of cancer cells. Currently only few effective inhibitors of this enzyme are known.

In the dissertation, there were obtained a set of heteroaromatic compounds, and their glycosides and glycoconjugates, capable of acting as FUT8 inhibitors. In this research work there were obtained sugar intermediates, derivatives mainly of L-fucose and L-rhamnose, non-sugar intermediates such as derivatives of purpurin, anthraquinone, 1,3,5-triazine, 1,3,4-thiadiazole, furan-2(5*H*)-one, 2*H*-pyrrol-2-one and 1,2,4-triazole, which were then used in the synthesis of complex sugar derivatives, inly L-rhamnose and L-fucose.

The obtained sugar derivatives were preliminarily evaluated for their biological activity on HCT116 and MCF-7 cell lines. The lowest IC₅₀ values on the tested cell lines were obtained for the **Ram38** derivative (4-(3,4-dichloro-5-hydroxy-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-on-1-yl)methylene)-1-(4-*O*-acetyl-2,3,6-trideoxy-L-*erythro*-hex-2-enopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazole), also was found to interact with FUT8 bacterial origin.

The results of the analyses allowed the preliminary determination of the structure of the fragments from which a potential inhibitor should be composed to interact with the FUT8 protein, which is a starting point for further research in this area.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	3
SPIS SKRÓTÓW.....	7
1. PRZEGLĄD LITERATUROWY.....	10
1.1. Metabolizm komórki zdrowej i nowotworowej	11
1.2. Cykl komórkowy.....	12
1.2.1. Kontrola cyklu komórkowego	13
1.2.2. Apoptoza.....	14
1.3. Fukozylotransferazy (FUTs).....	14
1.3.1. Fukozylotransferazy – budowa, klasyfikacja i mechanizm działania	15
1.3.2. Inhibitory fukozylotransferaz.....	16
1.3.3. Fukozylotransferaza 8 jako cel molekularny w projektowaniu potencjalnych leków.....	22
2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY	29
3. OMÓWIENIE WYNIKÓW	31
3.1. Otrzymanie substratów cukrowych	31
3.1.1. Synteza glikali.....	31
3.1.2. Synteza 2-deoksy-2-fluoro cukrów	34
3.1.3. Synteza azydopochodnych cukrów.....	35
3.1.4. Synteza alkynowych pochodnych 2-F-cukrów	39
3.2. Otrzymanie substratów heterocyklicznych	40
3.2.1. Otrzymywanie pochodnych antrachinonu	41
3.2.2. Otrzymywanie pochodnych 1,3,5-triazyny	44
3.2.3. Azydopochodne 1,2,4-triazolu.....	48
3.2.4. Pochodne furan-2(5 <i>H</i>)-onu i 2 <i>H</i> -pirol-2-onu	50
3.3. Otrzymywanie glikozydów oraz glikokoniugatów pochodnych cukrów.....	51
3.3.1. Alkoksylowe pochodne pseudoglikali L-ramnozy i L-fukozy.....	52
3.3.2. Antrachinonowe pochodne 2,3-nienasyconej L-ramnozy	56
3.3.3. Synteza pseudoglikali 1,3,5-triazyny pochodnych L-ramnozy.....	57
3.3.4. 2-deoksy-2-jodo- <i>N</i> -glikozydy pochodne tiadiazoli	60

3.3.5. 2-Deoksy-2-fluoropochodne 1,2,4-triazoli	64
3.3.6. Glikokoniugaty pochodne furan-2(5 <i>H</i>)-onu i 2 <i>H</i> -pirol-2-onu	66
3.3.7. Azolowe pochodne 2,3-nienasyconej L-ramnozy, otrzymane w wyniku reakcji przegrupowania Ferriera	68
PODSUMOWANIE	71
3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	74
5. WSTĘPNA OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ	149
5.1. Badania przeciwnowotworowe pochodnych furan-2(5 <i>H</i>)-onu i 2 <i>H</i> -pirol-2-onu ..	151
5.1.1. Cytotoksyczność badanych pochodnych	151
5.1.2. Hamowanie cyklu komórkowego i działanie proapoptotyczne	152
5.2. Badania przeciwnowotworowe pochodnych tiadiazoli.....	156
5.2.1. Cytotoksyczność badanych pochodnych	156
5.2.2. Efekty cytostatyczne na liniach komórek nowotworowych, po których następuje cykl komórkowy	158
5.2.3. Mechanizm śmierci indukowany w liniach nowotworowych.....	160
5.3. Badania biologiczne z udziałem α -1,6-fukozylotransferazy	164
5.3.1. Thermal Shift Assay (TSA)	164
5.4. Podsumowanie badań biologicznych.....	172
DOROBEK NAUKOWY	173
LITERATURA.....	176

SPIS SKRÓTÓW

Ac	Grupa acetylowa (acetyl)
AcOEt	Octan etylu
ADCC	Cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Kwas asparaginowy
ATP	Adenozynotrifosforan
BF ₃ ·Et ₂ O	Eterat trifluorku boru
Bn	Grupa benzykowa (benzyl)
BnBr	Bromek benzylu
Boc	Grupa <i>tert</i> -butyloksykarbonylowa
Boc ₂ O	Diwęglan di- <i>tert</i> -butylu
c	Stężenie molowe badanej próbki
CDK	Kinaza cyklinozależna
COVID-19	Choroba zakaźna układu oddechowego wywołana zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 (z ang. <i>coronavirus disease 2019</i>)
CuAAC	reakcja cykloadycji 1,3-dipolarnej, azydo-alkinowa katalizowana jonami miedzi Cu(I)
DBU	1,8-Diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DEAD	Azodikarboksylan dietylu (z ang. <i>diethyl azodicarboxylate</i>)
-dF/dT	pierwsza pochodna emisji fluorescencji w funkcji temperatury
DIPEA	diizopropylodetyloamina
DMAP	4-(Dimetylamino)pirydyna
DMF	Dimetyloformamid
DMSO	Dimetylosulfotlenek
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetylosulfotlenek deuterowany
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy (z ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> , DNA)
EGFR	Receptor epidermalnego czynnika wzrostu
ekw /eq	Ekwiwalent stechiometryczny
ER	Retikulum endoplazmatyczne
Er(OTf) ₃	Trifluorometanosulfonian erbu(III)
ESI(MS)	Z ang. <i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i> , technika w spektrometrii mas
FcγIIIa	Receptor III-A regionu gamma Fc immunoglobuliny o niskim powinowactwie
Fe(OTf) ₃	Trifluorometanosulfonian żelaza(III)
FUT1-FUT11	Enzymy, nazywane fukozylotransferazami 1 – 11
FUT8	α-1,6-fukozylotransferaza, fukozylotransferaza 8
<i>fut8</i>	Gen kodujący FUT8
FUT8-CDG	Wrodzone zaburzenie glikozylacji FUT8, z ang. <i>FUT8-Congenital Disorder of Glycosylation</i>
FUTs	Fukozylotransferazy
GA	Aparat Golgiego

GDP	Guanozyno-5'-difosforan
GDP-2-deoksy-2-fluoro-L-fukoza	Guanozyno-5'-difosforan 2-deoksy-2-fluoro-L-fukozy
GDP-6-deoksy-6-fluoro-L-fukoza	Guanozyno-5'-difosforan 6-deoksy-6-fluoro-L-fukozy
GDP-Fuc lub GDP- β -L-fukoza	Guanozyno-5'-difosforan L-fukozy
GDP-karba-fukoza	Guanozyno-5'-difosforan karba-fukozy
GDP-L-galaktoza	Guanozyno-5'-difosforan L-galaktozy
GlcNAc	N-acetylogalaktozamina
Glu	Kwas glutaminowy
GLUT	Białka, transportery glukozy
HCT116	Linia komórkowa raka jelita grubego
His	Histydyna
IC ₅₀	stężenie związku, przy którym dochodzi do zahamowania proliferacji komórkowej o 50% w stosunku do wariantu kontrolnego
IgG	Immunoglobulina G
<i>in vitro</i>	Eksperyment biologiczny prowadzony w warunkach laboratoryjnych
K _d	Stała dysocjacji
K _i	Stała inhibicji
K _m	Stała Michaelisa-Menten
LacNAc	N-acetylolaktozamina
Lys	Lizyna
MCF-7	Linia komórkowa raka piersi
MDM2	ligaza białkowa ubikwityny E3, z ang. <i>mouse double-minute 2 protein</i>
MDMX	Homologiczne białko do MDM2, z ang. <i>double-minute 4 protein</i>
Me	Grupa metylowa (metyl)
MeOH	Metanol
MeSO ₃ H	Kwas metanosulfonowy
mRNA	Matrycowy rodzaj kwasu rybonukleinowego, z ang. <i>messenger RNA</i>
MS	spektrometria masowa
MST	Termoforeza mikroskalowa (z ang. <i>Microscale Thermophoresis</i>)
MTT	sól tetrazoliowa, bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy
NIS	N-jodosukcynimid
NMR	Magnetyczny rezonans jądrowy (z ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NodZ	Rekombinowane, bakteryjne białko α -1,6-fukozylotransferazy
Nu ⁻	Nukleofil anionowy
NuH	Nukleofil obojętny dysponujący wolną parą elektronową
O-FUTs	O-fukozylotransferazy
PD-1	Białko 1 programowanej śmierci komórkowej
Pd(OAc) ₂	Octan palladu(II)

PI	Jodek propidyny
<i>PO-FUT1</i> i <i>PO-FUT2</i>	Białkowe <i>O</i> -fukozylotransferazy 1 i 2
PPh ₃	trifenylfosfina
ROS	Reaktywne formy tlenu (z ang. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SD	Odchylenie standardowe
Ser	Seryna
Selectfluor™	bis(tetrafluoroboran) 1-chlorometylo-4-fluoro-1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu lub F-TEDA
SF	Z ang. <i>Survival Fraction</i> , frakcja przeżywająca
<i>t</i> Bu	Grupa <i>tert</i> -butylowa, <i>tert</i> -butyl
TEA	trietyloamina
TGFβ1	Transformujący czynnik wzrostu β1
THF	Tetrahydrofuran
TLC	chromatografia cienkowarstwowa
T _m	temperatura topnienia białka
TMS	Tetrametylosilan
TMSN ₃	azydek trimetylosililu
t.p.	Temperatura pokojowa
TSA	Z ang. <i>Thermal Shift Assay</i>
T.t.	Temperatura topnienia
v/v	Stosunek objętościowy
Yb(OTf) ₃	Trifluorometanosulfonian iterbu(III)
¹³ C NMR	Węglowy magnetyczny rezonans jądrowy
¹ H NMR	Wodorowy magnetyczny rezonans jądrowy
α [†] _D	Skręcalność właściwa
β-1,4-GalT	β-1,4-galaktozylotransferaza
β-1,3-GlcNAcT	β-1,3- <i>N</i> -acetylglukozyloamino-transferaza
ΔT _m	Zmiana temperatury topnienia białka

1. PRZEGLĄD LITERATUROWY

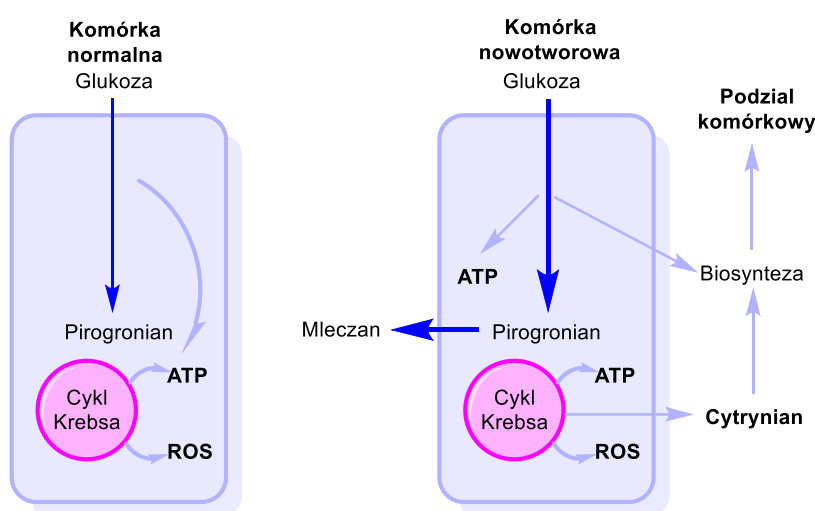
Ciągły rozwój cywilizacji i tryb życia warunkują zwiększającą się zapadalność na choroby takie jak choroby krążenia, cukrzyca oraz nowotwory. Te ostatnie są główną przyczyną zgonów na całym świecie, odpowiadając za blisko 10 milionów zgonów i 20 milionów nowych przypadków w 2020 roku. Najczęstszymi nowotworami pod względem liczby zgonów były nowotwory: płuc (1,8 miliona), okrężnicy i odbytnicy (9,16 tysiąca), wątroby (8,3 tysiąca), żołądka (7,69 tysiąca) oraz piersi (6,85 tysiąca) [1]. Wciąż zwiększająca się zapadalność na te choroby sprawia, że konieczne jest poszukiwanie nowych terapeutyków, które działałyby w sposób ściśle ukierunkowany, selektywnie na komórki zmienione chorobowo.

Nowotwór jest chorobą obejmującą intensywne zmiany genetyczne i metaboliczne w komórce bezpośrednio przyczyniające się do ich wzrostu i złośliwości. Zmiany w komórce, które powodują transformację komórki zdrowej w komórkę nowotworową, obejmują różnego rodzaju mutacje zachodzące w genomie. Te modyfikacje genetyczne przede wszystkim mają na celu wspieranie ciągłej proliferacji, dlatego zwiększane są możliwości biosyntezy komórek nowotworowych, w tym syntezy kwasów tłuszczowych i nukleotydów, natomiast β -oksydacja kwasów tłuszczowych i inne niepotrzebne już procesy metaboliczne są w nich zminimalizowane [2,3].

Różnorodne formy nowotworu i umiejscowienie w różnych tkankach organizmu powoduje, że współczesna terapia onkologiczna posługuje się różnymi metodami leczenia, często połączonymi w jeden schemat terapeutyczny. Oprócz radykalnej metody usunięcia operacyjnego nowotworu, naświetlania promieniowaniem jonizującym, miejscowego podwyższenia temperatury (hipertermia) ważnym narzędziem w walce z nowotworami jest chemioterapia. Pod tą nazwą kryje się duża liczba leków ukierunkowana na cele biologiczne, którymi mogą być poszczególne etapy cyklu komórkowego, receptory komórkowe, enzymy zaangażowane w procesy anaboliczne komórki, a także indukujące wybiórczo apoptozę komórki nowotworowej.

1.1 Metabolizm komórki zdrowej i nowotworowej

Każda komórka w sposób pośredni lub bezpośredni podlega metabolizmowi, czyli zbiorowi reakcji biochemicznych, które służą wytwarzaniu energii oraz syntezy niezbędnych makrocząsteczek. Zanim dojdzie do podziału replikacyjnego komórka musi powielić swój genom, białka i lipidy oraz złożyć te elementy w komórki potomne. Zwiększone tempo podziału komórek nowotworowych wymaga przeprojektowania szlaków metabolicznych, co prowadzi do powstania metabolizmu komórek nowotworowych (**rysunek 1**) [2-4].



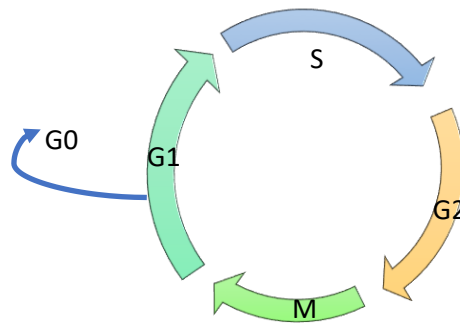
Rysunek 1. Porównanie metabolizmu komórki nowotworowej i zdrowej (na podstawie [4]).

W związku z dużym zapotrzebowaniem energetycznym, komórki nowotworowe charakteryzują się zwiększonym poborem glukozy, dzięki nadekspresji na swojej powierzchni białek transportujących glukozę (GLUT) [2], a zwiększona glikoliza, nawet w obecności tlenu w środowisku zapewnia dostarczenie energii oraz kwasu mlekowego jako produktu ubocznego. Fenomen ten nazwano efektem Warburga [2,3]. W wyniku tego procesu możliwe jest szybkie pozyskanie energii, jednak w mniej efektywny sposób w porównaniu do oddychania tlenowego. Z kolei otrzymany w wyniku glikolizy kwas mlekowy wydalany jest z komórki i może gromadzić się w tkankach nowotworowych, prowadząc do kwasicy środowiska wokół guza, co jest kolejną cechą charakterystyczną metabolizmu komórek nowotworowych [3,5].

Inhibicja głównych enzymów zaangażowanych w glikolizę może więc być potencjalną strategią terapeutyczną prowadzącą do zmniejszenia produkcji energii w komórkach nowotworowych i zakłócenia ich metabolizmu. Jednak ze względu na zdolność komórek nowotworowych do przystosowania się i przestawienia swojego metabolizmu na alternatywne szlaki metaboliczne, aby przetrwać i rozwijać się w obliczu zahamowania glikolizy, ta metoda może stanowić spore wyzwanie [2,5].

1.2 Cykl komórkowy

Kolejną cechą charakterystyczną komórek nowotworowych jest szereg zmian w cyklu komórkowym, przyczyniających się do ich niekontrolowanego wzrostu, podziału oraz unikania mechanizmów naprawczych.



Rysunek 2. Etapy cyklu komórkowego (na podstawie [6]).

Mitotyczny cykl komórkowy podzielony jest na dwa główne etapy – interfazę i mitozę, w których zachodzi odpowiednio duplikacja zawartości komórkowej i jej rozdzielenie na dwie genetycznie identyczne komórki potomne. Replikacja DNA zachodzi w interfazie podczas fazy S (faza syntezy), natomiast sam podział zachodzi podczas fazy M (mitoza). Okresy międzyfazowe, które oddzielają fazę S od fazy M, nazywane są “fazami przerwy” (z ang. *Gap phases*) – G1, występująca przed fazą S i G2 po fazie S, są kluczowe dla regulacji cyklu komórkowego (**Rysunek 2**).

Przed fazą S, podczas fazy G1, komórka może inicjować replikację DNA i wejść w cykl komórkowy, pozostać w fazie G1 lub może wyjść z cyklu komórkowego do nieproliferacyjnego stanu spoczynku G0. Po zakończeniu replikacji DNA (w fazie S) następuje faza G2, podczas której komórki przygotowują się do wejścia w fazę M,

inicjując kondensację chromatyny i wyrównanie chromosomów w centralnej części komórki. Faza M ma dwie funkcje, zarówno dokładnego oddzielenia zduplikowanego DNA (mitoza), jak i podział całej zawartości komórkowej na dwie nowe komórki potomne (cytokineza). W fazie M w komórkach dochodzi do segregacji materiału genetycznego i zresetowania cyklu komórkowego powracając do interfazy [7].

1.2.1. Kontrola cyklu komórkowego

Podstawowym regulatorem procesów zachodzących w cyklu komórkowym jest aktywność kinaz cyklinozależnych (CDK). Specyficzne cykliny produkowane i gromadzone są w różnych fazach cyklu komórkowego, których zmiany aktywności zależnie od cyklu komórkowego stymulują wejście, progresję i jego zakończenie [6].

W celu zapobiegania akumulacji i rozprzestrzenianiu się błędów genetycznych komórki korzystają z punktów kontrolnych cyklu komórkowego, zależnych od szlaków sygnalizacyjnych, których zadaniem jest obserwowanie występowania różnego rodzaju błędów [6].

Przykładem takiego punktu kontrolnego może być, zaobserwowanie podczas interfazy dwuniciowych pęknięć DNA, które wyzwała szybką odpowiedź sygnalizacyjną. W wyniku tej odpowiedzi uruchamiają się mechanizmy naprawy DNA i interakcja z regulatorami cyklu komórkowego. Jednym z takich mechanizmów jest nadekspresja czynnika transkrypcyjnego p53. Białko to aktywuje inhibitor CDK – p21, prowadząc do inhibicji kompleksów cyklina-CDK głównie w fazie G1, zapobiegając wejściu komórki w fazę S. Takie działanie prowadzi do spowolnienia lub zatrzymania cyklu komórkowego. Długotrwałe zatrzymanie cyklu skutkuje głównie nieodwracalnym wyjściem z cyklu komórkowego prowadząc do senescencji (starzenie komórkowe) lub apoptozy (kontrolowana śmierć komórki) [6].

Ważną modyfikacją potranslacyjną, która reguluje stabilność i funkcję białka p53 jest jego ubikwitynacja. Jest to proces polegający na utworzeniu połączenia reszt lizyny z białkiem, wykorzystując do tego 3 enzymy: enzym aktywujący ubikwitynę (E1), enzym wiążący ubikwitynę (E2) oraz ligazę białko-ubikwityna (E3).

Pośród tej grupy enzymów wyróżnić można białka MDM2 (z ang. *mouse double-minute 2 protein*) i MDMX (z ang. *double-minute 4 protein*) należące do ligaz ubikwityny

E3. Nadekspresję tych białek zaobserwowano w wielu rodzajach nowotworów i powiązano ją z obniżeniem poziomu (stężenia) oraz funkcji białka p53, co prowadzi do zwiększenia ryzyka rozwoju nowotworu. Aktywność białka MDM2 polega na jego związaniu się z p53 powodując jego degradację, uniemożliwiając białku p53 normalną pracę, a komórce umożliwiając przejście do fazy S. Z kolei białko MDMX jest krytycznym regulatorem ekspresji i funkcji MDM2. MDMX heterooligomeryzuje z MDM2, dzięki czemu między innymi może zwiększać stężenie MDM2 przez zakłócenie jego degradacji. Podobnie jak MDM2, białko MDMX może wiązać się z p53, jednak jego działanie nie jest ukierunkowane na degradację białka p53, tylko wiążąc się z MDM2, wraz z nim synergistycznie hamuje aktywność transkrypcyjną p53 [8].

1.2.2. Apoptoza

Występowanie ciągłych podziałów komórkowych wywołanych przez mutacje promujące wejście w fazę S, poprzez zapobieganie apoptozie oraz powstrzymywanie komórki nowotworowej przed wyjściem z cyklu komórkowego jest kolejną cechą charakterystyczną komórek zmienionych nowotworowo [6].

Ważnym procesem regulującym rozwój i eliminację komórek uszkodzonych, starzejących się lub nieprawidłowych jest apoptoza. W kontekście nowotworów, apoptoza odgrywa ważną rolę jako mechanizm zapobiegający niekontrolowanemu wzrostowi i rozprzestrzenianiu się komórek nowotworowych jednak, komórki nowotworowe często rozwijają mechanizmy, które umożliwiają im uniknięcie apoptozy i przetrwanie, co przyczynia się do ich niekontrolowanego wzrostu [9].

Z tego powodu wykorzystanie apoptozy jest przedmiotem intensywnych badań naukowych. Istnieje wiele strategii terapeutycznych, które mają na celu indukowanie apoptozy w komórkach nowotworowych. Niektóre z tych strategii obejmują: inhibitory białek antyapoptotycznych, aktywatory apoptozy, terapię genową oraz terapię celowaną [9].

1.3 Fukozylotransferazy (FUTs)

Inną metodą służącą do hamowania proliferacji komórek nowotworowych jest inhibowanie enzymów pełniących niezbędne funkcje w zachowaniu ich rozwoju.

Do takich enzymów należą fukozylotransferazy, których zadaniem jest włączanie reszt L-fukozy do struktur glikanów, uczestnicząc pośrednio w funkcjonalizacji białek. Występowanie reszt L-fukozy w glikanach sprawia, że struktury te biorą udział w wielu procesach patofizjologicznych, takich jak na przykład choroby o podłożu immunologicznym, przerzutowanie nowotworowe, czy przekazywanie sygnałów.

Wśród fukozylotransferaz na szczególne wyróżnienie zasługuje fukozylotransferaza 8 (FUT8), wbudowująca reszty L-fukozy do struktur rdzeniowych glikanów. Zwiększoną ekspresję fukozylotransferazy 8 wykazano w komórkach nowotworowych (wątroby, piersi, jajnika, prostaty, płuc, trzustki, żołądka, i innych), co powoduje, że enzym ten może z powodzeniem posłużyć jako potencjalny cel molekularny oraz marker diagnostyczny wielu rodzajów nowotworów.

1.3.1. Fukozylotransferazy – budowa, klasyfikacja i mechanizm działania

Fukozylotransferazy (FUTs) to rodzina enzymów, należących do nadrodziny glikozylotransferaz (EC 2.4.1.), które katalizują transfer jednostek cukrowych L-fukozy z donora substratu (guanozynodifosforanu β -L-fukozy, GDP- β -L-fukozy) na substrat typu akceptora (oligosacharyd, glikopeptyd lub glikolipid).

Fukozylowane oligosacharydy uczestniczą w wielu procesach biologicznych, np. w interakcjach podczas transfuzji krwi oraz zakażeń mikrobiologicznych, a także w sygnalizacji za pośrednictwem receptorów Notch (błonowe białka sygnałowe, regulujące proliferację, różnicowanie i śmierć komórki [10]). Zaburzenia w ekspresji fukozylowanych oligosacharydów zaobserwowano w wielu procesach patologicznych, w tym w nowotworach i miażdżycy [11].

W ludzkim genomie zidentyfikowano 13 różnych fukozylotransferaz, wśród których FUT1 – FUT11 zlokalizowane są w aparacie Golgiego (GA), natomiast *PO-FUT1* i *PO-FUT2* występują w retikulum endoplazmatycznym (ER) [11]. W zależności od typu tworzonego wiązania glikozydowego w reakcjach enzymatycznych, FUTs klasyfikuje się na α -1,2-fukozylotransferazy (FUT1 i FUT2), α -1,3/4-fukozylotransferazy (FUT3 – FUT7 i FUT9), α -1,6-fukozylotransferazę (FUT8) oraz białkowe *O*-fukozylotransferazy (*PO-FUT1* i *PO-FUT2*) [12]. Pod względem specyficzności substratowej i miejsca działania

α -1,2- i α -1,3/4-fukozylację zazwyczaj obserwuje się na końcach łańcuchów cukrowych, z kolei α -1,6-fukozylacja zachodzi w strukturze rdzeniowej *N*-glikanów [13].

Pod względem budowy α -1,2-, α -1,3/4- i α -1,6-fukozylotransferazy u eukariotów są transmembranowymi białkami typu II, zbudowanymi z *N*-końcowego ogona ulokowanego w przestrzeni cytoplazmatycznej, domeny transmembranowej, regionu macierzystego (rdzeniowego) oraz skierowanej do światła GA globularnej *C*-końcowej domeny katalitycznej, która odpowiada za przyłączanie donora glikozylowego do akceptora [14,15]. *O*-FUTs są z kolei białkami rozpuszczalnymi, zlokalizowanymi w ER, odpowiedzialnymi za przyłączanie reszty L-fukozy bezpośrednio do reszty seryny lub treoniny łańcucha polipeptydowego [11,14,16].

1.3.2. Inhibitory fukozylotransferaz

Specyficzne i silne inhibitory FUTs służą do regulacji biosyntezy glikanów. Z uwagi na rolę fukozylowanych glikanów w wielu procesach patologicznych, inhibitory FUTs mogą być nowymi środkami terapeutycznymi w leczeniu chorób wynikających z nieprawidłowej ekspresji FUTs [17].

Trudności w projektowaniu efektywnych inhibitorów FUTs związane są z występowaniem takich czynników jak: niskie powinowactwo enzymu do substratu typu akceptora oraz złożoność stanu przejściowego, w którym udział biorą donor i akceptor substratu, a w niektórych przypadkach także jon metalu [15]. Ponieważ większość FUTs to białka transbłonowe, trudno jest otrzymać je w formie krystalicznej, a tym samym niewiele wiadomo o ich danych krystalograficznych. Pełną strukturę krystalograficzną kompleksu GDP z ludzką FUT8 opublikowano dopiero w 2020 roku [18].

Inhibitory glikozylotransferaz projektowane są w oparciu o struktury donora i akceptora. Analogi donora i analogi stanu przejściowego, które złożone są z elementów donora (nukleotydów cukrowych) są bardzo silnymi inhibitorami ze względu na ich wysokie powinowactwo do enzymu (zwykle w zakresie mikromoli). Jednak trudno jest otrzymać selektywny inhibitor glikozylotransferaz oparty o strukturę donora, ponieważ glikozylotransferazy zwykle wykorzystują wspólny donor glikozylowy. Z kolei analogi akceptora mogą być selektywnymi inhibitorami, jednak ze względu na to, że akceptory glikozylu mają powinowactwo do tych enzymów w zakresie milimolowym, aktywność

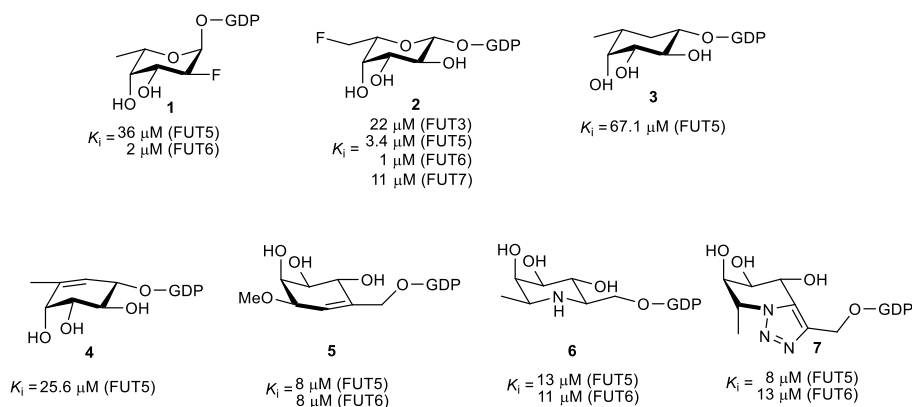
inhibująca analogów akceptora jest raczej niska. W odróżnieniu do powyższych, analogi bisubstratowe, w których analog donora i akceptora są ze sobą połączone wiązaniem kowalencyjnym mogą zapewnić zarówno silną, jak i selektywną inhibicję [19].

Pomimo tego, że do dziś nie otrzymano jeszcze żadnych małowcząsteczkowych leków działających jako inhibitory FUT8 [18], to jednak opracowano kilka strategii otrzymywania inhibitorów FUTs, które można podzielić na cztery główne kategorie: analogi donora substratu, analogi akceptora substratu, inhibitory bisubstratowe oraz inhibitory niecukrowe [15,20].

1.3.2.1. Inhibitory fukozylotransferaz – cukrowe analogi typu donora substratu

Glikozylotransferazy wykazują wysokie powinowactwo do substratów typu donora (nukleotydy cukrowe, takie jak GDP-Fuc dla FUTs) i produktów ubocznych reakcji katalitycznej (fosforan nukleozydu, taki jak GDP dla FUTs). Otrzymano więc szereg nukleotydów cukrowych i ich analogów jako inhibitorów FUT poprzez modyfikację reszty cukrowej lub fosforanowej, m.in. analogów cukrowych zawierających atomy fluoru, analogów karbacukrowych i analogów stanu przejściowego. Atomy fluoru wprowadza się do cząsteczki proleku lub inhibitora enzymu ze względu na jego wysoką elektroujemność oraz wysoką trwałość wiązania C-F. Wprowadzenie atomu fluoru pozwala na zwiększenie stabilności wiązania glikozydowego przez destabilizację jonu oksokarbeniowego, który powstaje w stanie przejściowym reakcji katalitycznej. Wychodząc z L-fukozy i L-galaktozy otrzymano GDP-2-deoksy-2-fluoro-L-fukozę (**1**) oraz GDP-6-deoksy-6-fluoro-L-fukozę (**2**, **Schemat 1**), które hamowały aktywność FUT3 – FUT7 z wartością stałej inhibicji $K_i = 1 \mu\text{M} - 33 \mu\text{M}$ [15,21].

Karbacukry, zarówno syntetyczne jak i naturalne mają różne zastosowania w biologii i medycynie. Wiązanie glikozydowe w GDP-fukozie jest podatne na hydrolizę w warunkach kwaśnych lub pod wpływem enzymów, natomiast jego analog – GDP-karba-fukoza (**3**, **Schemat 1**) jest bardzo stabilny, dzięki zastąpieniu atomu tlenu pierścienia cukrowego ugrupowaniem metylenowym. Taka modyfikacja znacznie poprawiła stabilność na hydrolizę oraz pozwoliła na zachowanie dobrego powinowactwa z wartością $K_i = 67.1 \mu\text{M}$ wobec FUT5 [15,22,23].



Schemat 1. Przykłady analogi donora substratu, jako inhibitorów FUTs (na podstawie [15,21]).

Analogi stanu przejściowego to związki, które przypominają stan przejściowy reakcji katalizowanej przez enzym. Inhibitory projektowane w ten sposób nazywane są analogami lub inhibitorami stanu przejściowego. Na ogół wartości K_i analogów stanu przejściowego są niższe od K_m substratów, ze względu na silniejsze powinowactwo enzymu do stanu przejściowego niż do substratów. W reakcji katalizowanej przez FUTs, stan przejściowy reakcji charakteryzuje się obecnością pierścienia L-fukozy o konformacji półkrzesłowej z wydłużonym wiązaniem glikozydowym oraz dodatnim ładunkiem powstającym w wyniku utworzenia się jonu oksokarbeniowego.

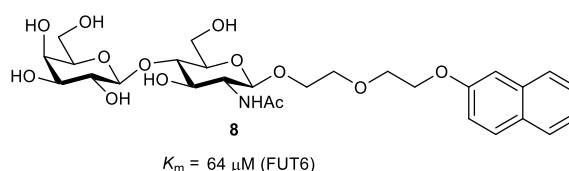
W oparciu o wyżej wymienione kryteria zaprojektowano i otrzymano karbacukrowy analog GDP-fukozy (**4**, **Schemat 1**), zawierający w swojej strukturze wiązanie podwójne między atomami C-5 i C-6 cykloheksenu, dzięki czemu analog ten mimikuje wcześniej wspomnianą konformację półkrzesłową. W odniesieniu do nasyconego karbacukru związek ten wykazywał silniejszą inhibicję z $K_i = 25.6 \mu\text{M}$ dla FUT5 [22].

Innym karbacukrowym analogiem stanu przejściowego jest pochodna **5** (**Schemat 1**), która w swojej strukturze posiada dodatkową grupę metylenową pomiędzy karba-fukozą a GDP. Taka modyfikacja pozwoliła na imitację wydłużonego wiązania glikozydowego, występującego w stanie przejściowym reakcji enzymatycznej. Z kolei obecność wiązania nienasyconego w strukturze karbacukru pozwoliła na otrzymanie konformacji półkrzesłowej. Wykazano, że związek ten hamuje aktywność FUTs z wartością $K_i = 8 \mu\text{M}$ dla FUT5 oraz $6 \mu\text{M}$ dla FUT6 [24].

Podobnie jak w przypadku związku **5**, zaprojektowano kolejne dwa analogi stanu przejściowego to jest **6** i **7** (**Schemat 1**) z ugrupowaniem metylenowym naśladującym wydłużone wiązanie glikozydowe. Jednak w odróżnieniu do poprzednich struktur w pierścieniu cukrowym atom tlenu zamieniono na atom azotu. Związki te w fizjologicznym pH ulegają protonowaniu, co z kolei naśladuje obecność dodatniego ładunku przejściowego jonu oksokarbeniowego. Michael wraz z zespołem wykazali, że pochodna **6** wykazuje aktywność inhibującą FUTs z $K_i = 8 \mu\text{M}$ dla FUT5 oraz $13 \mu\text{M}$ dla FUT6, natomiast **7** – $K_i = 13 \mu\text{M}$ dla FUT5 oraz $11 \mu\text{M}$ dla FUT6 [24].

1.3.2.2. Inhibitory fukozylotransferaz – cukrowe analogi typu akceptora substratu

Ze względu na fakt, że akceptorem substratu jest reszta GlcNAc, inhibitory z grupy analogów akceptora substratu projektowane są jako pochodne GlcNAc. Mong wraz z zespołem otrzymali serię pochodnych LacNAc, o różnych aglikonach na węglu anomerycznym glukozy. Wyniki ich badań dla FUT6 wskazały, że wolna GlcNAc wykazała aktywność z $K_m = 4.6 \text{ mM}$, natomiast pochodna **8** (**Schemat 2**) skutecznie konkuruje o miejsce aktywne z LacNAc z wartością $K_m = 64 \mu\text{M}$ [15,25].



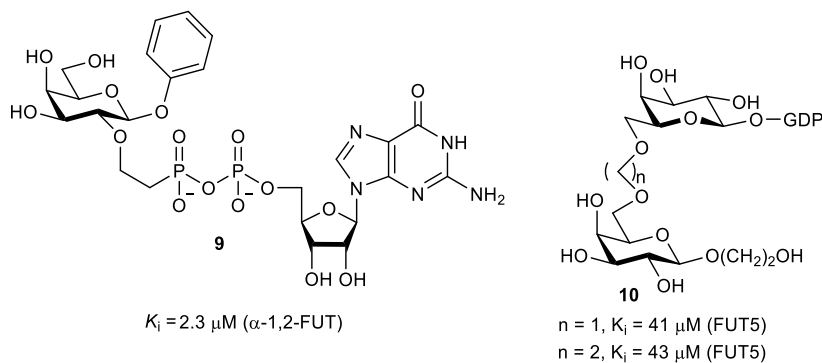
Schemat 2. Przykładowy analog akceptora substratu, jako inhibitor FUT6 (na podstawie [15,25]).

1.3.2.3. Bisubstratowe inhibitory fukozylotransferaz

W reakcji katalizowanej przez glikozylotransferazy w reakcji przeniesienia biorą udział trzy elementy: reszta cukrowa, nukleotyd i akceptor. Ze względu na to analogi bisubstratowe powinny zawierać wszystkie te trzy elementy, ale termin ten może odnosić się także do analogów zawierających jedynie dwa elementy, np. pozbawionych reszty cukrowej lub nukleotydu [19].

Inhibitory bisubstratowe projektowane są w taki sposób, aby równocześnie zawierały zarówno donor jak i akceptor substratu. Otrzymano pochodną **9** (**Schemat 3**),

w którym β -fosforan GDP połączony jest z atomem tlenu na C-2 galaktozy poprzez linker etylenowy, który wykazuje cechy kompetycyjnego inhibitora dla α -1,2-FUT wobec GDP-fukozy z wartością $K_i = 2.3 \mu\text{M}$ [15,26].



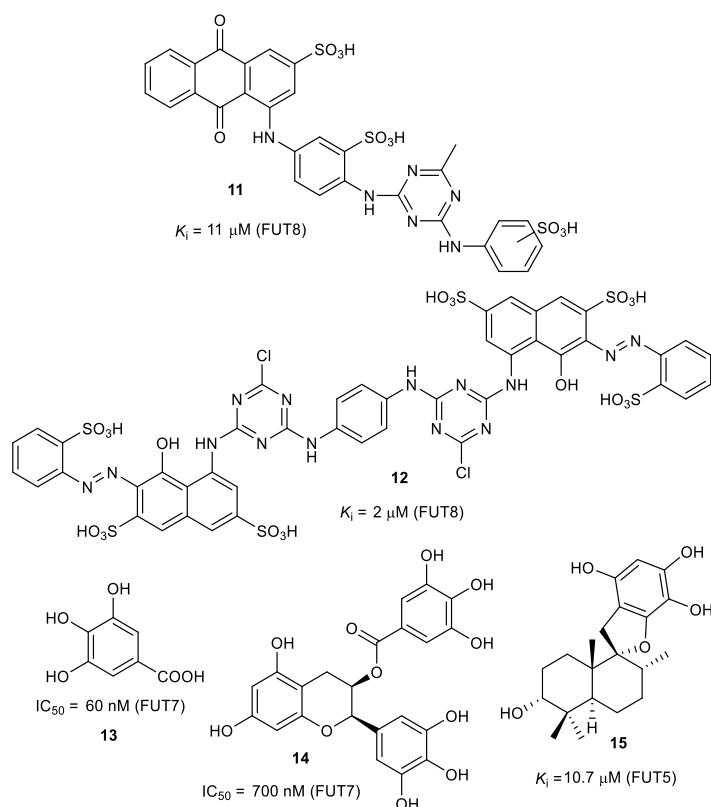
Schemat 3. Przykłady bisubstratowych inhibitorów FUTs (na podstawie [15,26,27]).

Innymi bisubstratowymi inhibitorami są struktury **10** (Schemat 3), otrzymane przez przyłączenie 2-hydroksyetylo- β -D-galaktozydu do atomu tlenu na atomie C-6 GDP-L-galaktozy przez łącznik metylenowy lub etylenowy. Związki te kompetycyjnie inhibują FUT5 z wartościami $K_i = 41 \mu\text{M}$ i $43 \mu\text{M}$ (odpowiednio dla $n=1$ i $n=2$) [15,27].

1.3.2.4. Niecukrowe inhibitory fukozylotransferaz

Pierwsze niecukrowe inhibitory dla FUT8 zaproponowała Kamińska wraz z zespołem. W swoich badaniach oceniała ona aktywność inhibującą serii barwników triazynowych wobec glikozylotransferaz. Wyniki tych badań wykazały, że Cibacron Blue 3GA (**11**, Schemat 4) oraz Reactive Red 120 (**12**, Schemat 4) kompetycyjnie hamują aktywność FUT8 ze stałą inhibicji odpowiednio $K_i = 11 \mu\text{M}$ oraz $2 \mu\text{M}$, ze względu na możliwość naśladowania nukleozasady w GDP-Fuc. Ze względu jednak na zbyt dużą masę cząsteczkową związki te nie zostały zbadane w testach *in vitro* [15,28].

Kolejnymi pochodnymi badanymi pod kątem aktywności inhibującej fukozylotransferazy był kwas galusowy (**13**, Schemat 4) i jego pochodna, galusan (-)-epigalokatechiny (**14**, Schemat 4). Niu wraz z zespołem opisali te pochodne jako inhibitory FUT7, z nieodwracalną, zależną od czasu inhibicją o wartościach odpowiednio $IC_{50} = 60 \mu\text{M}$ i $700 \mu\text{M}$ [29].

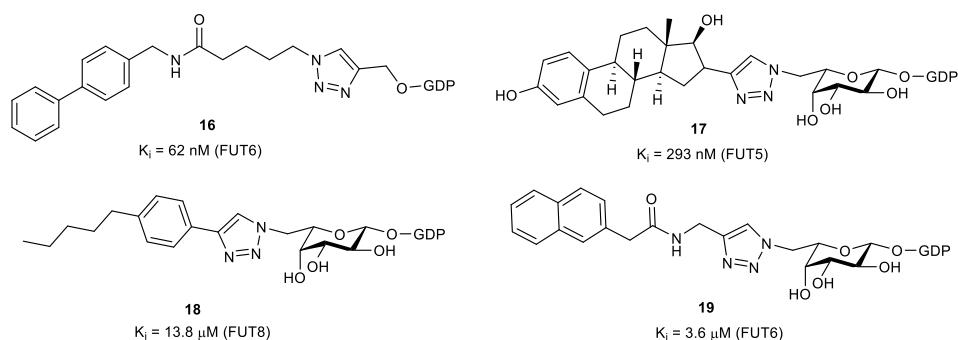


Schemat 4. Przykłady niecukrowych inhibitorów FUTs (na podstawie [15,28–30]).

Z kolei Lin wraz zespołem zbadali naturalną pochodną kwasu galusowego – stachybotrydial (**15**, **Schemat 4**) i zidentyfikowali ją jako niekompetycyjny inhibitor FUT5 w odniesieniu do GDP-fukozy z wartością $K_i = 10.7 \mu\text{M}$ [15,30].

1.3.2.5. Analogi GDP-fukozy

Otrzymano szereg pochodnych GDP oraz GDP-fukozy, na drodze syntezy w warunkach *click chemistry*, które poddano testom aktywności na FUTs [15,17,31,32]. Lee wraz zespołem w wyniku reakcji *click chemistry*, wychodząc z propargilowej pochodnej GDP otrzymał związek **16** (**Schemat 5**), który okazał się być silnym inhibitorem wobec FUT6 z wartością $K_i = 62 \text{ nM}$ [31].



Schemat 5. Przykłady analogów GDP-fukozy jako inhibitorów FUTs (na podstawie [15,28–30]).

Hosoguchi wraz zespołem z zastosowaniem tej samej metody otrzymali pochodne **17** i **18** (Schemat 5) wychodząc z GDP-6-azydo-L-fukozy. W testach aktywności tych pochodnych wykazali, że związek **17** jest inhibiorem FUT5 z wartością $K_i = 239 \text{ nM}$, natomiast związek **18** jest inhibitorem FUT8 z $K_i = 13.8 \text{ }\mu\text{M}$. Hosoguchi wraz zespołem otrzymali pochodną **19**, która hamuje aktywność FUT6 z $K_i = 3.6 \text{ }\mu\text{M}$ [15].

1.3.3. Fukozylotransferaza 8 jako cel molekularny w projektowaniu potencjalnych leków

Fukozylotransferaza 8 (FUT8, α -1,6-fukozylotransferaza) jest białkiem występującym u większości eukariotów. Enzym ten katalizuje transfer reszty L-fukozy z donora substratu (GDP- β -L-fukozy) na redukujący koniec GlcNAc złożonych *N*-glikanów (rdzeń), z utworzeniem wiązania α -1,6-glikozydowego, z odwróceniem konfiguracji na C-1 przenoszonej L-fukozy [33]. Reszta L-fukozy przenoszona za pomocą tego enzymu do rdzenia glikanu jest nazywana *fukozą rdzeniową*. W przeciwieństwie do innych glikozylotransferaz reakcja katalizowana FUT8 nie jest zależna od obecności kofaktorów – jonów metali dwuwartościowych [11,12,34–36].

Gen *fut8* ulega ekspresji w wielu ludzkich tkankach, takich jak: mózg, łożysko, płuca, żołądek i jelito cienkie [37,38], jednak szczególna jego nadekspresja występuje w mózgu [33,39,40]. Wykazano, że w przeciwieństwie do innych FUTs, wyłączenie aktywności FUT8 związane jest ze wczesną śmiercią postnatalną, znacznym opóźnieniem wzrostu oraz zmianami w płucach, co sugeruje znaczenie fukozytacji rdzeniowej w aktywacji receptora czynnika wzrostu [12,35,37,41–43]. Wykazano również silne powiązanie fukozytacji rdzeniowej z występowaniem stanów zapalnych [44,45],

odpornością [46], zaostrzeniem COVID-19 [47], jak również z powstawaniem komórek nowotworowych i przerzutowaniem [12,48].

Fukozylacja rdzeniowa ma wpływ na aktywność wielu receptorów ulokowanych na powierzchni komórki, między innymi: transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), który odpowiada między innymi za kontrolę wzrostu komórki, proliferacji, różnicowania i apoptozy oraz receptora epidermalnego czynnika wzrostu (EGFR), który odpowiada za regulację proliferacji komórki [18].

FUT8 jest również zaangażowana w procesy adhezji i migracji komórek poprzez regulację aktywności integryny $\alpha 3/\beta 1$, receptora adhezji komórkowej, ważnego w utrzymaniu integralności błony komórkowej, prawdopodobnie uczestnicząc w regulacji funkcji, przeżywalności i przerzutowaniu komórek nowotworowych [49]. Wykazano również, że fukozylacja rdzenia powoduje zmniejszenie powinowactwa przeciwciała immunoglobularnego G (IgG), wytwarzanego przez limfocyty B i odgrywającego rolę w odpowiedzi odpornościowej, do Fc γ IIIa, białka błonowego, odpowiadającego za wiązanie się z przeciwciałami IgG, wywołując cytotoksyczność zależną od przeciwciał (ADCC). Zjawisko to znalazło zastosowanie w rozwoju terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych nowej generacji, które skuteczniej wiążą się z Fc γ IIIa i wykazują lepszą cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (ADCC) [18,33].

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że u myszy, mutacja polegająca na całkowitym wyłączeniu FUT8 powoduje poważne opóźnienie wzrostu i rozwoju fenotypu płuc przypominającego rozedmę, prawdopodobnie z powodu zaburzenia regulacji sygnalizacji receptorów TGF $\beta 1$ i EGFR [37,49]. Zwierzęta te wykazują również nieprawidłowości behawioralne. Podobne objawy obserwuje się również u pacjentów z zaburzeniem glikozylacji FUT8 (FUT8-CDG). W przeciwieństwie jednak do tego schorzenia, który charakteryzuje się wygaszeniem aktywności FUT8, w wielu nowotworach dochodzi do podwyższenia ekspresji FUT8, co związane jest ze złym rokowaniem. W komórkach raka piersi i czerniaka zwiększona aktywność FUT8 sprzyja przerzutowaniu [18].

Nadekspresję genu *fut8* zaobserwowano w wielu różnych typach nowotworów, co może wynikać z co najmniej trzech różnych mechanizmów:

- a) regulacji ekspresji białka 1 programowanej śmierci komórkowej (PD-1) [50],

- b) modyfikacji cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC) [49,51],
- c) regulacji TGF- β 1 [52], EGFR [53], integryny α 3 β 1 [33,36,54] oraz E-kadheryny [33,36,55].

Przesiewowe badanie poziomu fukozylowanych białek pozwala na odróżnienie pacjentów chorych na nowotwór od pacjentów zdrowych i wykorzystywane jest jako marker nowotworowy [56–59]. Przykładowo zwiększona fukozylacja rdzeniowa α -fetoproteiny jest markerem nowotworowym raka wątrobowokomórkowego i pozwala odróżnić tę chorobę od przewlekłej choroby wątroby [18,33,36]. Wykazano również, że poziomy białka FUT8 oraz jego mRNA są wysokie i specyficznie podwyższone w ludzkich gruczolakorakach surowiczych jajnika [33,36].

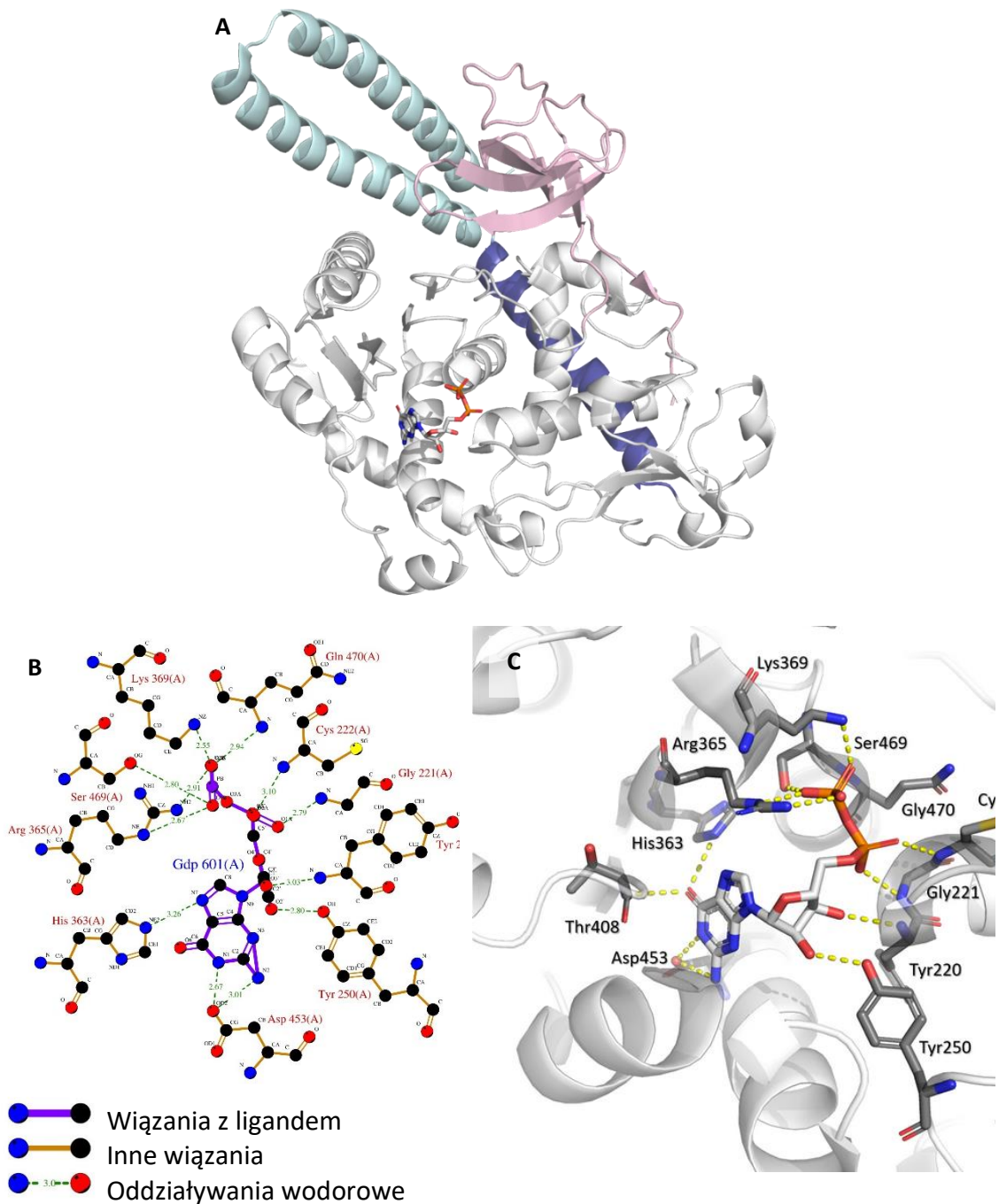
Ze względu na to, że poziom FUT8 jest podwyższony w wielu typach nowotworów, zahamowanie aktywności tego enzymu może być obiecującą strategią poprawy przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej.

W 2007 roku Ihara wraz z współpracownikami po raz pierwszy opublikowali ogólną strukturę FUT8, która składa się głównie z *N*-końcowej domeny cewkowej, domeny katalitycznej i *C*-końcowej domeny SH3. Wykazano, że Asp368 i Lys369 obecne w elastycznej pętli FUT8 mają istotny wpływ na aktywność enzymu, z kolei Asp409 i Asp453 mogą mieć kluczową rolę w katalizie [33].

W 2020 roku Jarva wraz z współpracownikami pokazali ludzką FUT8 jako apoenzym, w kompleksie z GDP, które w tym układzie przypomina donor substratu, oraz z glikopeptydem jako akceptorem substratu (**Rysunek 3**). W ich eksperymentach Ser469, Arg365, Asp453 oraz His363 zostały określone jako konserwatywne miejsca w FUT8, dostarczając nowych informacji mogących posłużyć projektowaniu nowych kompetycyjnych inhibitorów dla tego enzymu [18,60].

Ponadto, wykazano, że dwie pętle mają najbardziej widoczne zmiany szkieletowe: Arg365-Ala375 (pętla A) i Asn429-Ser446 (pętla B). Obie te pętle uległy uporządkowaniu po związaniu i całkowitym zamknięciu GDP. Po rekombinacji, pomiędzy Asp368 i Arg365 w pętli A oraz Arg441 w pętli B utworzyły się mostki disiarczkowe. Struktura trójskładnikowego kompleksu FUT8, GDP oraz *N*-glikanu w roli akceptora reszty cukrowej wykazała, że Glu373 działa jako zasada katalityczna, podczas gdy Lys369

decyduje o przeniesieniu protonu. Ponadto wykazano, że domena SH3 odpowiada za rozpoznawanie rozgałęzienia – *N*-glikanu [49,60].



Rysunek 3. A) Struktura białka ludzkiej FUT8; na biało zaznaczono domenę katalityczną, na jasnoniebiesko domenę *N*-kończową, na jasnoróżowo *C*-kończową domenę SH3, a na ciemnoniebiesko łącznik. Na rysunkach **B** i **C** graficznie przedstawiono sposób wiązania GDP w centrum aktywnym FUT8 (rysunek przygotowany przez mgr. inż. W. Bagrowską).

Przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu zbadanie specyficzności działania FUT8 w odniesieniu do akceptora oligosacharydowego. Garcia-Garcia wraz z zespołem zaobserwowali, że wcześniejsze wiązanie FUT8 z GDP- β -L-fukozą powoduje silniejsze wiązanie się białka do *N*-glikanu [47].

1.3.3.1. Inhibitory fukozylotransferazy 8

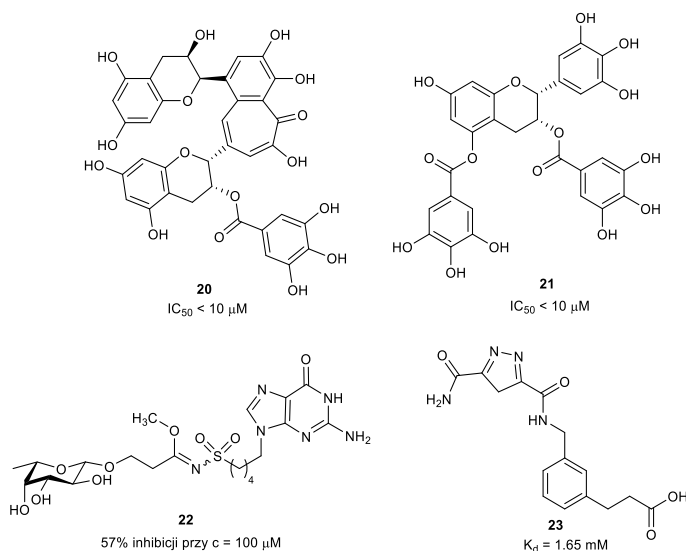
Liczne wyniki badań wskazują na fundamentalne znaczenie sjalowanych i fukozylowanych glikanów, wciąż jednak brakuje inhibitorów, które mogłyby się przyczynić do zbadania dokładniejszej funkcji tych glikanów w komórkach zarówno zdrowych jak i zmienionych chorobowo.

Jednym ze sposobów jest zastosowanie analogów stanu przejściowego, zawierających silnie elektroujemny atom fluoru ustawiony proksymalnie do pozycji anomerycznej. Struktury te skuteczne są w badaniach na białku, jednak ze względu na ich duży ładunek ujemny, mogą nie być skuteczne w badaniach w warunkach komórkowych, ze względu na ich trudności w przenikaniu przez błony [61]. Wykazano jednak, że fluorowane i sjalowane analogi L-fukozy mogą zostać przetransportowane do wnętrza komórki, gdzie w szlakach metabolicznych monosacharydów ulegają hydrolizie przekształcając się w inhibitory typu analogów donora substratu [61].

Rillahan wraz z zespołem udowodnili, że GDP-2-deoksy-2-fluoro-L-fukoza oraz GDP-6-deoksy-6-fluoro-L-fukoza kompetycyjnie inhibują działanie FUT8 odpowiednio z $IC_{50} = 2.5 \mu M$ i $IC_{50} = 2.8 \mu M$ [61]. Jednak badania zespołów Lee i Bukharta wskazują, że związki te mają podobne działanie względem innych FUTs (FUT3 – FUT7) [21,31,61]. Przy zastosowaniu tych związków w badanych komórkach zaobserwowano znaczące zredukowanie wszystkich rodzajów fukozytacji, co potwierdza, że acetylowane pochodne 2-fluoro-L-fukozy są silnymi inhibitorami FUTs, jednak nie są selektywne, co może prowadzić do wielu komplikacji w ich zastosowaniu [61].

W odróżnieniu do inhibitorów α -1,2- i α -1,3-FUTs, które mają już opracowane silne i selektywne inhibitory, badania nad inhibitorami FUT8 były w ostatnich dekadach znacząco utrudnione ze względu na brak informacji o dokładnej strukturze krystalograficznej tego białka. Ze względu na to, kilka inhibitorów FUT8 otrzymano tylko w oparciu o testy aktywności [60].

Jones wraz z współpracownikami przeprowadzili wysokoprzepustowe badania przesiewowe biblioteki produktów naturalnych, w których wykazali, że pochodne kwasu galusowego **20** i **21** (**Schemat 6**) znacząco hamują aktywność FUT8 z $IC_{50} < 10 \mu M$ [60,62].



Schemat 6. Przykłady inhibitorów FUT8 (na podstawie [60,62–64]).

Jak już wcześniej wspomniano, w badaniach zespołu Kamińskiej na temat barwników triazynowych, struktury te dzięki naśladowaniu naturalnie występujących w układach biologicznych heterocykli wykazują interesującą aktywność inhibującą wobec FUT8 (Cibacron Blue 3GA $K_i = 11 \mu M$, **11**, Reactive Red 120 $K_i = 2 \mu M$, **12**). Jednak związki te nie są selektywne w swoim działaniu, ponieważ wykazały również aktywność wobec innych glikozylotransferaz (α -1,2-FUT, β -1,4-GalT oraz β -1,3-GlcNAcT) [60].

Manambe wraz z zespołem otrzymali i zbadali w testach aktywności sulfonamidowe pochodne cukrów, w których grupa sulfonamidowa była mimetykiem ugrupowania difosforanowego. Wyniki ich eksperymentów wskazały, że przy zastosowaniu stężenia $100 \mu M$ pochodna **22** (**Schemat 6**) hamowała aktywność FUT8 w 57% [60,64].

W 2019 roku Strecker wraz z współpracownikami na podstawie struktury ludzkiej FUT8 (PDB: 2DE0) ustalili model wiązania donora substratu. Do otrzymanego modelu zadokowali oni bibliotekę 700 tys. modeli z bazy ZINC, z których wybrano dwa małowcząstkowe modele dokujące się po dwóch przeciwnych stronach miejsca wiążącego, które połączono w jedną cząsteczkę i ponownie zadokowano, aby zająć jego

całą powierzchnię. Otrzymany w ten sposób ligand **23** (**Schemat 6**) w badaniach *in silico* wykazywał lepszą energię wiązania w porównaniu do GDP-fukozy oraz tworzył stabilne wiązania wodorowe do wcześniej opisanych kluczowych reszt aminokwasów (Asp453, His363 i Arg365). Zachęceni tymi wynikami naukowcy otrzymali pochodną **23**, a następnie poddali badaniom aktywności. Wykazano, że związek ten wiąże się do białka FUT8 ze stałą dysocjacji $K_d = 1.65 \text{ mM}$ [60,63].

2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

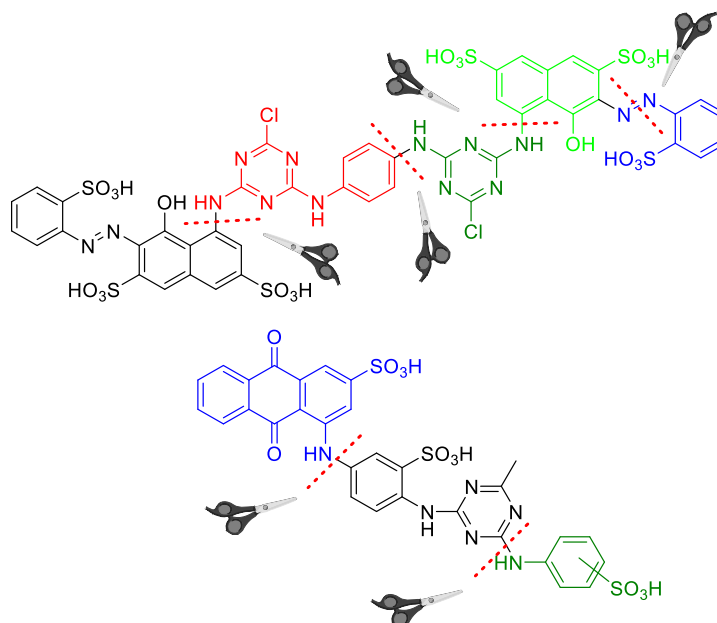
Jednym ze sposobów służących hamowaniu proliferacji komórek zmienionych chorobowo jest inhibicja enzymów pełniących kluczowe funkcje w ich metabolizmie. Wśród tych enzymów znajdują się fukozylotransferazy, których zadaniem jest włączanie reszt L-fukozy do struktur glikanów, uczestnicząc pośrednio w funkcjonalizacji białek. Występowanie reszt L-fukozy w glikanach sprawia, że struktury te biorą udział w wielu procesach patofizjologicznych, takich jak choroby o podłożu immunologicznym, przerzutowanie nowotworowe, czy przekazywanie sygnałów.

Swierdzona nadekspresja fukozylotransferazy 8 w komórkach nowotworowych, pozwala uznać ten enzym jako potencjalny cel molekularny oraz marker diagnostyczny wielu rodzajów nowotworów.

Dotąd nie otrzymano inhibitora zmniejszającego aktywność FUT8 w sposób selektywny i efektywny. Z tego powodu w ramach pracy doktorskiej podjęto próbę otrzymania nowych struktur, które mogą być efektywnymi inhibitorami fukozylotransferazy 8.

W ramach pracy doktorskiej zaplanowano otrzymać struktury przypominające stan przejściowy reakcji enzymatycznej, a więc pochodne cukrów o konformacji półkrzesłowej, którą posiadają 2,3-nienasycone pochodne L-fukozy i L-ramnozy. Analogicznie do stanu przejściowego powinny charakteryzować się obecnością ładunku dodatniego powstającego w wyniku utworzenia się jonu oksokarbeniowego. Taki efekt można otrzymać przez wprowadzenie atomu fluoru na C-2 pierścienia cukrowego. Dlatego zdecydowano się również otrzymać 2-deoksy-2-fluoropochodne L-fukozy.

Biorąc pod uwagę znaną aktywność inhibującą barwników triazynowych Cibacron Blue 3Ga i Reactive Red 120, zdecydowano się na ich defragmentację (**rysunek 4**) i połączenie poszczególnych fragmentów z pochodnymi cukrów, w celu poddania ocenie, który z tych elementów może odpowiadać za ich aktywność.



Rysunek 4. Schemat fragmentacji barwników triazynowych

Istnieje szereg doniesień literaturowych, według których pochodne azolowe przez podobieństwo w liczbie elektronów mogą przypominać ugrupowanie fosforanowe. Z tego względu w ramach pracy doktorskiej postanowiono również otrzymać cukrowe pochodne azoli jako potencjalne inhibitory enzymów z grupy fukozylotransferaz [60,63–65].

Badania podzielono na dwie części, część chemiczną i część biologiczną. W części chemicznej zaplanowano ścieżki syntezy, pozwalające otrzymać pochodne o potencjalnej zdolności hamowania aktywności FUT8. Prace eksperymentalne obejmą kilka grup związków: substraty cukrowe (glikale, 2-deoksy-2-fluorocukry, azydki cukrowe), substraty niecukrowe (pochodne antrachnonu, 1,2,3-triazyny, 1,2,4-triazolu, 1,3,4-oksadiazolu, 1,3,4-tiadiazolu, furan-2(5*H*)onu, 2*H*-pirol-2-onu) oraz glikokoniugaty.

Część biologiczna obejmie podstawowe testy pozwalające zakwalifikować zsyntezowane związki jako biologicznie aktywne. Zaplanowano wykonanie testów cytotoksyczności, badania cyklu komórkowego na modelowych liniach nowotworowych (HCT116 i MCF-7) a także badania z udziałem α -1,6-fukozylotransferazy: oznaczenie temperatury denaturacji kompleksu enzym-badany związek (TSA) i termoforezę mikroskalową (MST).

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

3.1. Otrzymanie substratów cukrowych

Pierwszym etapem syntezy glikokoniugatów było otrzymanie wybranych pochodnych cukrowych będących donorami reszty cukrowej.

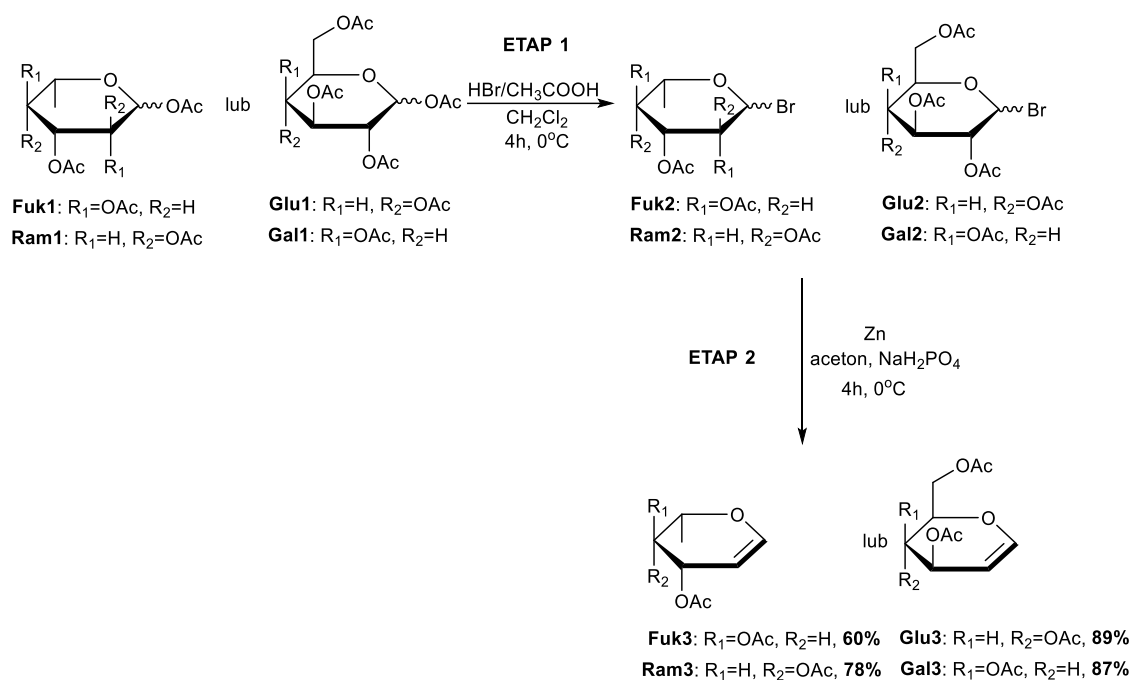
3.1.1. Synteza glikali

Pierwszą grupą modeli cukrowych, pełniących rolę substratów wyjściowych niezbędnych do otrzymywania zaplanowanych glikokoniugatów były acetylowe i benzytowe pochodne glikali. Spośród wielu metod opisanych w literaturze, najczęściej stosowaną reakcją otrzymywania glikali jest redukcja odpowiedniego bromku glikozyłu. W tym celu, per-*O*-acetylowane pochodne cukrowe (per-*O*-acetylowaną-L-fukopiranozę (**Fuk1**), per-*O*-acetylowaną-L-ramnopiranozę (**Ram1**), per-*O*-acetylowaną-D-glukopiranozę (**Glu1**) oraz per-*O*-acetylowaną-D-galaktopiranozę (**Gal1**)) poddano działaniu 33% roztworu bromowodoru w kwasie octowym, w temperaturze 0 °C otrzymując odpowiednie bromki glikozyłowe z dobrymi wydajnościami (**Schemat 7, Etap 1, Fuk2, Ram2, Glu2 i Glu2**). Ze względu na dużą reaktywność otrzymanych pochodnych użyto ich w kolejnym etapie syntezy bez dodatkowego oczyszczania [66,67].

Bromki glikozyłowe poddano reakcji redukcji pyłem cynkowym otrzymując odpowiednie glikale. W celu doboru najbardziej optymalnych warunków prowadzących do otrzymania glikalu przeprowadzono reakcję redukcji według dwóch różnych procedur opisanych w literaturze [68,69].

Pierwsza metoda polegała na zastosowaniu jako katalizatora bis(cyklopentadienylo)tytanu(III) (Cp_2TiCl_2) zredukowanego metalicznym manganem [69]. Reakcja redukcji bromku fukozyłu (**Fuk2**) z udziałem tego katalizatora była prowadzona w temperaturze pokojowej w THF przez 12h, do całkowitego przereagowania **Fuk2**. Analizując przebieg reakcji metodą TLC obserwowano, że oprócz produktu głównego powstawały również liczne produkty uboczne, co można tłumaczyć zwiększoną reaktywnością bromku fukozyłowego. Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania substratu, reakcję zakończono, metaloorganiczny katalizator

oddzielono od mieszaniny reakcyjnej na lejku Büchnera. Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żel krzemionkowym w układzie *n*-heksan:octan etylu, otrzymując **Fuk3** z niską wydajnością 38%. Tak niska wydajność produktu mogła również wynikać z jego zaadsorbowania na katalizatorze. Reakcję powtórzono w tych samych warunkach, jednak w miejsce sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem, katalizator oddzielono od mieszaniny reakcyjnej poprzez dekantację, a następnie wielokrotne przemycie go octanem etylu. Zastosowanie takiej zmiany w wydzielaniu produktu wpłynęło na zwiększenie jego wydajności do 45%.



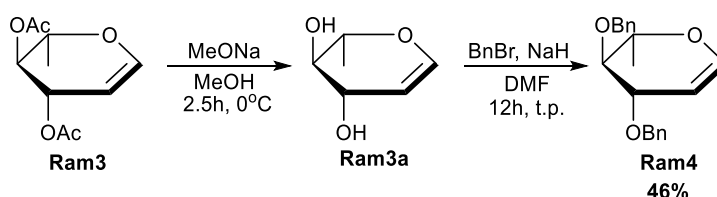
Schemat 7. Synteza glikali **Fuk3**, **Ram3**, **Glu3** i **Gal3** (na podstawie [66–68]).

Ze względu na niezadowalającą wydajność reakcji zastosowano inne warunki redukcji bromku fukozylowego. W drugiej metodzie zastosowano jako czynnik redukujący pył cynkowy, a reakcję prowadzono w mieszaninie aceton:bufor fosforanowy (1:2, v/v), w temperaturze 0 °C (**Schemat 7, Etap 2**) [68]. Analizując przebieg reakcji w odstępach czasowych co 1 godzinę (metoda TLC) zaobserwowano po 4 godzinach prowadzenia reakcji pojawienie się licznych produktów ubocznych. Wydłużenie czasu reakcji do 6h nie wpłynęło na zwiększenie stopnia przereagowania do oczekiwanego produktu, jedynie przyczyniło się do zwiększenia ilości produktów ubocznych. Z tego względu zdecydowano się na zakończenie reakcji mimo niecałkowitego przereagowania substratu cukrowego przez odsączenie cynku pod

zmniejszonym ciśnieniem na lejku Büchnera. Po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej produkt otrzymano z niezadowalającą wydajnością 35%. Zamiana sączenia na dekantację roztworu z nadpyłu cynkowego pozwoliła zwiększyć wydajność 3,4-di-*O*-acetylo-L-fukalu (**Fuk3**) do 60%.

W analogicznych warunkach redukcji cynkiem, otrzymano pozostałe glikale: 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnal (**Ram3**), 3,4,6-tri-*O*-acetylo-D-glukal (**Glu3**) oraz 3,4,6-tri-*O*-acetylo-D-galaktal (**Gal3**). Produkty w pierwszej kolejności wydzielono z mieszanin reakcyjnych poprzez dekantację i oczyszczanie na kolumnie chromatograficznej. Pochodne uzyskano w postaci żółtawych, krzepnących syropów z całkowitą wydajnością w zakresie 78% - 89%.

Kolejny model cukrowy 3,4-di-*O*-benzylo-L-ramnal (**Ram4**) otrzymano [70] w wyniku hydrolizy grup acetylowych 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**), a następnie ponownego ich zabezpieczenia grupami benzyłowymi (**schemat 8**).



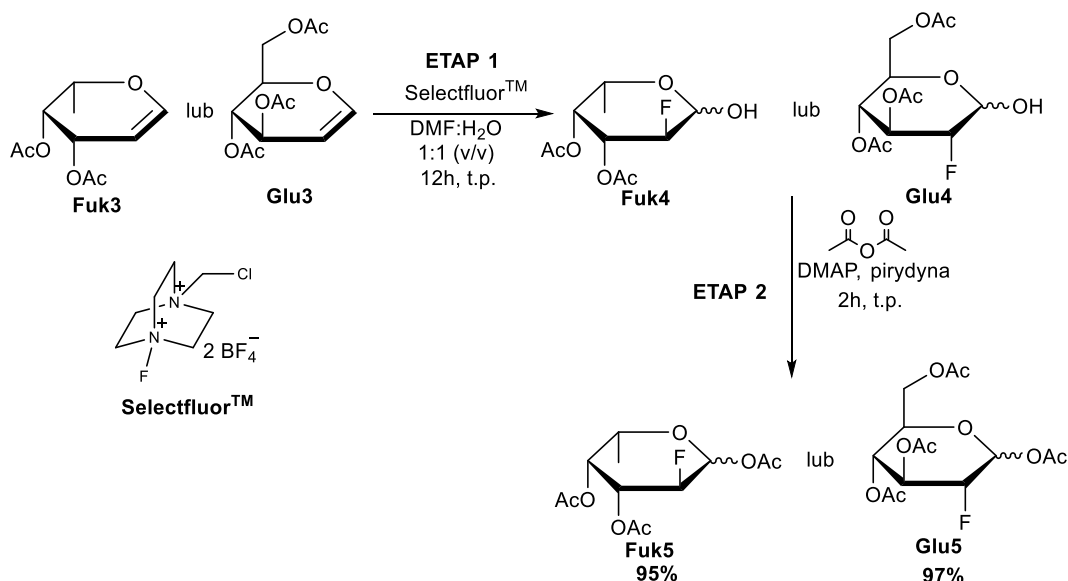
Schemat 8. Reakcja otrzymywania 3,4-di-*O*-benzylo-L-ramnopyranozy (**Ram4**) (na podstawie 70).

Grupy acetylowe usunięto w reakcji z metanolanem sodu w metanolu. Po 2.5 godz. prowadzenia reakcji stwierdzono całkowite przereagowanie substratu, reakcję zakończono przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej kwasowej żywicy jonowymiennej (Amberlyst®15). Następnie po usunięciu kationitu i odparowaniu rozpuszczalnika surowy produkt **Ram3a** poddano reakcji alkilowania bromkiem benzyłu w DMF, w obecności NaH. Reakcję prowadzono początkowo przez 2 godz. w temperaturze 0 °C, a następnie przez 12 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie zaobserwowano całkowite przereagowanie substratu, a produkt reakcji wydzielono metodą ekstrakcji i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, otrzymując **Ram4** w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju, z wydajnością 46%.

Na podstawie porównania analizy widm ^1H NMR i ^{13}C NMR otrzymanych glikali z danymi literaturowymi potwierdzono strukturę otrzymanych pochodnych [71–73].

3.1.2. Synteza 2-deoksy-2-fluoro cukrów

W kolejnym etapie zsyntezowano 2-deoksy-2-fluoro-pochodne L-fukozy (**Fuk4** i **Fuk5**) oraz D-glukozy (**Glu4** i **Glu5**). Synteza tych pochodnych polegała na wprowadzeniu atomu fluoru na atom węgla C-2 odpowiedniego glikalu w wyniku reakcji addycji do wiązania 1,2-nienasyconego (**schemat 9**).



Schemat 9. Reakcja otrzymywania 2-fluoropochodnych **Fuk4** i **Glu4**. (na podstawie [74]).

3,4-Di-*O*-acetylo-L-fukal (**Fuk3**) i 3,4,6-tri-*O*-acetylo-D-glukal (**Glu3**) poddano działaniu czynnika fluorującego jakim jest Selectfluor™. Selectfluor™ (bis(tetrafluoroboran) 1-chlorometylo-4-fluoro-1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu lub F-TEDA) jest łagodnym, stabilnym na działanie powietrza i wilgoci, nielotnym odczynnikiem stosowanym do elektrofilowego fluorowania. Zastosowanie go jako czynnika fluorującego pozwala na jednoetapowe wprowadzenie atomu fluoru do substratów organicznych, często w sposób regioselektywny [75]. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej, w mieszaninie rozpuszczalników DMF/H₂O (1:1 v/v), wpływającej na zwiększenie regioselektywności wprowadzania atomu fluoru w pozycję C-2 cukru [74]. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej, po 12 godz. obserwując całkowite przereagowanie substratu. Produkty reakcji wydzielano metodą

chromatografii kolumnowej, na żelu krzemionkowym, otrzymując **Fuk4** i **Glu4**, z wydajnościami odpowiednio 76% i 82%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju. Różnice w wydajności mogły wynikać z większej reaktywności L-fukalu, dla którego zaobserwowano większą ilość produktów ubocznych.

W zależności od kolejnych planowanych syntez, w reakcjach stosowano 2-deoksy-2-fluoropochodne z wolną grupą -OH w pozycji anomerycznej lub ich O-acetylowane odpowiedniki. Acetylowanie grupy anomerycznej pozwoliło na otrzymanie pochodnych z grupą łatwoodchodzącą na atomie węgla C-1, a także zwiększało ich stabilność podczas dłuższego przechowywania.

Acetylowanie prowadzono w standardowych warunkach, bezwodnikiem octowym w bezwodnej pirydynie, w obecności DMAP jako katalizatora, przez 12 godz., w temperaturze pokojowej. Produkty oczyszczono metodą chromatografii na żelu krzemionkowym, otrzymując odpowiednio 1,3,4-tri-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozę (**Fuk5**) i 1,3,4,6-tetra-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-D-glukopiranozę (**Glu5**), z wydajnościami odpowiednio 95% i 97% jako mieszaniny anomerów, w postaci bezbarwnych, krzepnących olejów, których struktury potwierdzono analizą widm ^1H i ^{13}C NMR.

Dla pochodnej **Fuk5** dublety o przesunięciu 91.54 ppm i 89.14 ppm na widmie węglowym pochodzące od atomów węgla C-1 i C-2 pierścienia cukrowego potwierdzają obecność atomu fluoru w pozycji C-2. W analogiczny sposób zinterpretowano widma dla pozostałych 2-deoksy-2-fluoropochodnych. Dodatkowym potwierdzeniem otrzymania pożądaných struktur było wyznaczenie mas cząsteczkowych metodą ESI(MS).

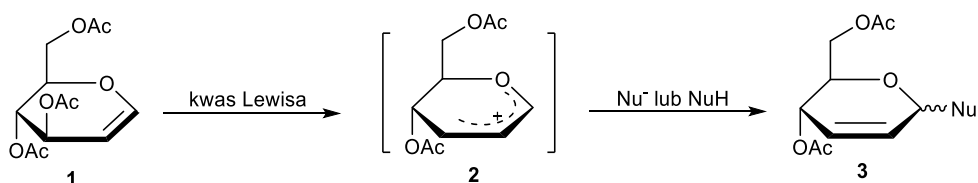
3.1.3. Synteza azydopochodnych cukrów

Kolejną grupą pochodnych stanowiących substraty do otrzymania zaplanowanych glikokoniugatów były azydkowe pochodne cukrowe. Tego typu pochodne stosowane są w wielu typach reakcji chemicznych, między innymi w reakcjach *click chemistry*. Metoda ta pozwala na otrzymanie pierścienia 1,2,3-triazolu i za jego pośrednictwem łączenia dwóch mniejszych fragmentów w większą cząsteczkę [76,77]. 1,2,3-Triazol posiada właściwości farmakoforowe, a jego pochodne mogą być

"strukturami wiodącymi" w projektowaniu nowych związków biologicznie aktywnych, wpływając na zwiększenie ogólnej hydrofilowości cząsteczki [78,79].

W tej części pracy badawczej otrzymano zarówno azydki glikozyłowe, w których grupa N_3 znajdowała się bezpośrednio na węglu C-1, jak również alkiloazydkowe pochodne cukrów, w których ugrupowanie azydkowe połączone jest z pierścieniem cukrowym łącznikiem alkilowym. W pierwszej kolejności przeprowadzono reakcję wprowadzenia grupy azydkowej na węgiel anomeryczny w warunkach przegrupowania Ferriera prowadzące do otrzymania 2,3-nienasyconych pochodnych cukrów. Celem otrzymania tego typu pochodnych było odwzorowanie struktury występującej w stanie przejściowym reakcji enzymatycznej, a więc o konformacji półkrzesłowej oraz wydłużonym wiązaniu glikozydowym.

Przegrupowanie Ferriera (typu I) jest reakcją chemiczną pozwalającą na przekształcenie glikalu (1,5-anhydroheks-1-enitolu, np. **1**, **Schemat 10**) w 2,3-nienasyconą pochodną glikozyłową (np. **3**, **Schemat 10**). Przegrupowanie Ferriera można rozpatrywać jako reakcję substytucji nukleofilowej z przegrupowaniem allilowym glikalu, katalizowaną kwasem Lewisa [80]. Najpierw zachodzi eliminacja podstawnika z atomu węgla C-3, powstaje pośredni zdelokalizowany jon oksykarbeniowy (**2**, **schemat 10**) stabilizowany przez sprzężenie z grupą winylową. Następnie allilowy jon oksykarbeniowy **2** reaguje z *O*-, *S*-, *N*- lub *C*-nukleofilem na węglu anomerycznym, dając mieszaninę anomeryczną 2,3-nienasyconych glikozydów, z dużą α -stereoselektywnością [81,82]. W przegrupowaniu Ferriera stosowane są jako katalizatory kwasy Lewisa (np. $BF_3 \cdot Et_2O$, $FeCl_3$, $InCl_3$, $CeCl_3$, $ZnCl_2$, $Pd(OAc)_2$, $Er(OTf)_3$, $Yb(OTf)_3$, $Fe(OTf)_3$, $TiCl_4$), kwasy Brönsteda (np. H_2SO_4 , H_3PO_4 , PPh_3/HBr , $HClO_4$) oraz inne (np. I_2 , NIS, DDQ) [83].

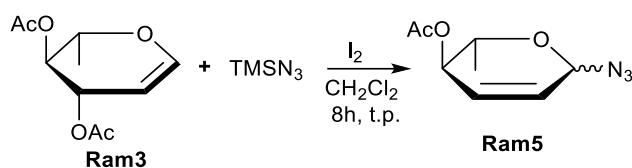


Schemat 10. Reakcja przegrupowania Ferriera (typu I) (na podstawie [82]).

Otrzymane w ten sposób 2,3-nienasycone cukry szeroko wykorzystywane są w syntezie wielu bioaktywnych cząsteczek, takich jak bloki budulcowe glikopeptydów,

oligosacharydów, kwasów uronowych, modyfikowanych węglowodanów oraz niektórych antybiotyków i nukleozydów [83].

Do otrzymania 2,3-nienasyconych azydkowych pochodnych cukrów w pierwszej kolejności przeprowadzono reakcję 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**) z azydkiem trimetylosililu (TMSN₃), jako donorem ugrupowania azydkowego w obecności jodu jako katalizatora (**schemat 11**) [84]. Zdecydowano się na zastosowanie takich warunków reakcji ze względu na ich łagodny charakter oraz niską cenę i nietoksyczność katalizatora.

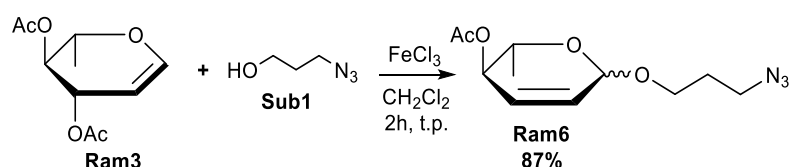


Schemat 11. Reakcja otrzymywania azydku 4-*O*-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozylowego (**Ram5**) (na podstawie [84]).

Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej w bezwodnym CH₂Cl₂, z dodatkiem sit 4Å, w celu uniknięcia konkurencyjnej reakcji z wodą. Po 8 godz. reakcję zakończono obserwując całkowite przereagowanie substratu cukrowego. Otrzymano azydek 4-*O*-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozylowy (**Ram5**) z wydajnością 78%, w postaci mieszaniny anomerów w proporcji α:β = 1:1.5, którego strukturę potwierdzono analizą widm ¹H i ¹³C NMR. Następnie z 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**) i 3-azydopropan-1-olu (**Sub1**) otrzymano azydoalkilopochodną L-ramnozy (**Ram6**), w której grupa azydkowa jest oddalona od pierścienia cukrowego przez trójwęglowy łańcuch alifatyczny.

Przed przystąpieniem do syntezy pochodnej **Ram6** w pierwszej kolejności zgodnie z procedurą opisaną w literaturze przez Wolf i współpracowników [85] otrzymano 3-azydopropan-1-ol (**Sub1**). W tym celu 3-bromopropan-1-ol poddano działaniu azydku sodu (NaN₃) w wodzie. Reakcję prowadzono przez 1 dobę w temperaturze 60 °C, po czym mieszaninę reakcyjną ekstrahowano octanem etylu otrzymując **Sub1** z bardzo dobrą wydajnością 96%. Otrzymany azydoalkohol **Sub1** poddano reakcji z 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnałem (**Ram3**) w warunkach przegrupowania Ferriera, w obecności BF₃·Et₂O jako katalizatora. W tych warunkach jednak, pomimo prowadzenia reakcji w łaźni lodowej, w temperaturze 0 °C zaobserwowano dużą ilość

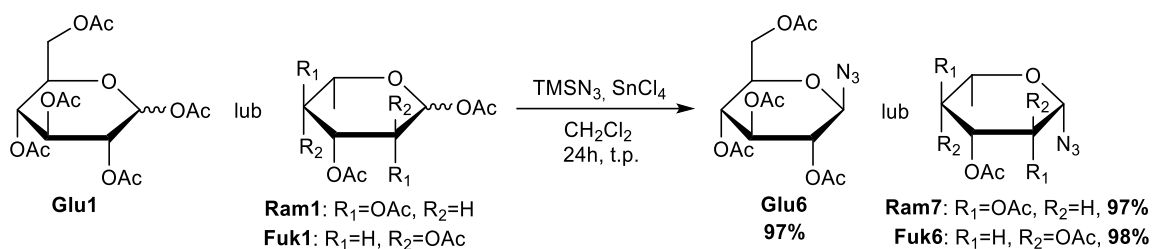
powstających produktów, a w krótkim czasie zaobserwowano zwężenie mieszaniny reakcyjnej. Można z tego wnioskować, że zastosowany katalizator okazał się być zbyt reaktywny dla tego typu substratów cukrowych jakim są 6-deoksycukry. Zdecydowano się reakcję powtórzyć stosując nieco słabszy kwas Lewisa, jakim jest chlorek żelaza(III) (FeCl_3) (schemat 12).



Schemat 12. Reakcja otrzymywania 3-azydopropylu 4-*O*-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozydu (**Ram6**) (na podstawie [86]).

Po 2 godz. prowadzenia reakcji analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie substratu cukrowego. Produkt 3-azydopropylu 4-*O*-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (**Ram6**) otrzymano z bardzo dobrą wydajnością 87%, jako mieszaninę anomerów, w proporcji $\alpha:\beta = 1:6$.

W kolejnym etapie badań otrzymano w reakcji substytucji nukleofilowej anomerycznej grupy acylowej ugrupowaniem azydkowym azydopochodne cukrów **Glu6**, **Fuk6** i **Ram7** (schemat 13).

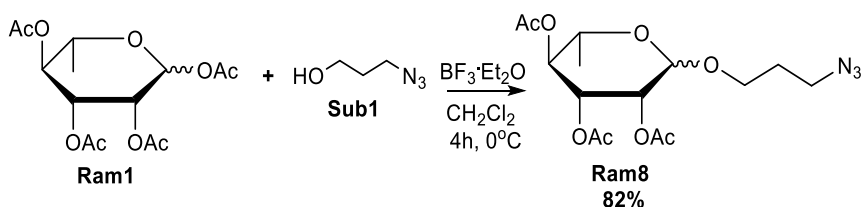


Schemat 13. Synteza anomerycznych azydków glikozylowych **Glu7**, **Fuk7** i **Ram7** (na podstawie [87]).

Wychodząc z per-*O*-acetylowanych pochodnych cukrów (w tym 6-deoksycukrów), z udziałem chlorku cyny (SnCl_4) jako katalizatora oraz TMSN_3 jako donora grupy azydkowej, otrzymano azydki anomeryczne z bardzo dużymi wydajnościami, bez konieczności ich dodatkowego oczyszczania [87]. Niezależnie

od zastosowanej pochodnej cukrowej, produkty otrzymano z bardzo dobrymi wydajnościami rzędu 97% - 98%.

Otrzymano również alkiloazydopochodną L-ramnozy (**Ram8**) w reakcji glikozylacji **Ram1** 3-azydopropan-1-olem **Sub1** w obecności kwasu Lewisa ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) jako katalizatora reakcji (**schemat 14**). Kwas ten jest często stosowany w reakcjach glikozylacji, w których donorem glikozyłu jest per-*O*-acetylowany cukier posiadający acetylową grupę łątowniczą na węglu anomerycznym [79]. Po 8 godz. prowadzenia reakcji analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie substratu, reakcję zakończono, a produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej, otrzymując 3-azydopropyl 2,3,4-tri-*O*-acetylo- β -L-ramnopiranozyd (**Ram8**) z wydajnością 82%, jako anomer β .

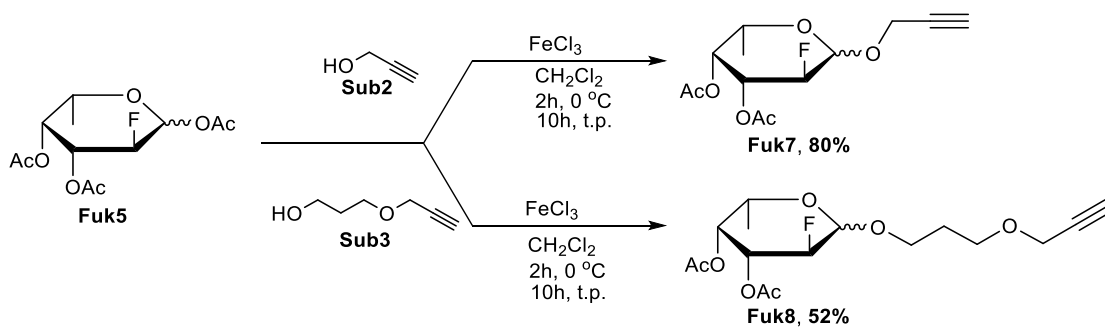


Schemat 14. Synteza 3-azydopropyl 2,3,4-tri-*O*-acetylo- β -L-ramnopiranozydu (**Ram8**) (na podstawie [88]).

Struktury otrzymanych produktów **Ram5-Ram8**, **Fuk6** oraz **Glu6** potwierdzono analizą widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Charakterystyczna dla pochodnej **Ram5** była obecność na widmie protonowym multipletów o przesunięciach 5.76, 5.81, 5.93 i 5.99 ppm, pochodzących od protonów H-2 i H-3, potwierdzających obecność wiązania 2,3-nienasyconego oraz odpowiednia ilość sygnałów pochodzących od ugrupowań acetylowych. Dla wszystkich otrzymanych pochodnych strukturę potwierdzono spektrometrią mas ESI(MS), która potwierdziła obecność 3 atomów azotu w cząsteczce.

3.1.4. Synteza alkinowych pochodnych 2-F-cukrów

Ostatnią grupą substratów cukrowych, które otrzymano były glikozydy alkinowe 2-fluoro-L-fukozy. Pochodne te otrzymano w celu zastosowania ich w reakcji koniugacji z azydkami heteroaromatycznymi w warunkach reakcji *click chemistry*.



Schemat 15. Reakcja otrzymywania **Fuk7** oraz **Fuk8**.

Traktowanie 1,3,4-tri-*O*-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozy (**Fuk5**) alkoholem propargilowym (**Sub2**) lub 3-prop-2-ynoksypropan-1-olem (**Sub3**) wobec FeCl₃ daje propargilo 3,4-di-*O*-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozyd (**Fuk7**) z 80% wydajnością lub 3-prop-2-ynoksypropylo 3,4-di-*O*-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozyd (**Fuk8**) z wydajnością 52% (**schemat 15**). Czas reakcji w wypadku tych reakcji wynosił 10 godz. Analiza ¹H i ¹³C NMR potwierdziła otrzymanie pożądanych struktur jako mieszaniny anomarów w stosunku anomerycznym odpowiednio $\alpha:\beta = 2:1$ (**Fuk7**) i $\alpha:\beta = 1:1$ (**Fuk8**).

Charakterystyczna dla **Fuk7** była obecność na widmie protonowym dubletu i trypletu o przesunięciach odpowiednio 4.33 ppm i 2.48 ppm, pochodzących od ugrupowania propargilowego. Ponadto zaobserwowano na widmie węglowym dublety w zakresie 85.67-91.77 ppm potwierdzające obecność atomu fluoru w pozycji C-2 pierścienia cukrowego. Dodatkowym potwierdzeniem otrzymania pożądanych struktur było wyznaczenie metodą ESI(MS) mas cząsteczkowych. Podobnie potwierdzono strukturę **Fuk8**.

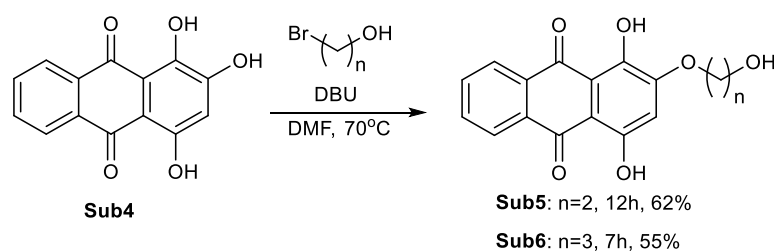
3.2. Otrzymanie substratów heterocyklicznych

Glikokoniugaty otrzymane w ramach pracy badawczej zostały tak zaplanowane, aby zawierały w swojej budowie resztę cukrową, łącznik i część aromatyczną, której struktura wiodąca stanowiła fragmenty barwników triazynowych (**rysunek 4**) lub mogła przypominać ugrupowania występujące w znanych inhibitorach FUTs (**Schemat 5**).

W związku z tym, jako fragmenty barwników triazynowych otrzymano pochodne 1,3,5-triazyny oraz antrachinonu, natomiast pochodne 1,2,4-triazolu, furan-2(5*H*)-onu i 2*H*-pirol-2-onu, zostały zaplanowane jako izostery ugrupowania fosforanowego [65]. Dlatego na tym etapie pracy badawczej skupiono się na otrzymaniu fragmentów aromatycznych o takich strukturach, aby możliwe było ich późniejsze połączenie z substratami cukrowymi.

3.2.1. Otrzymywanie pochodnych antrachinonu

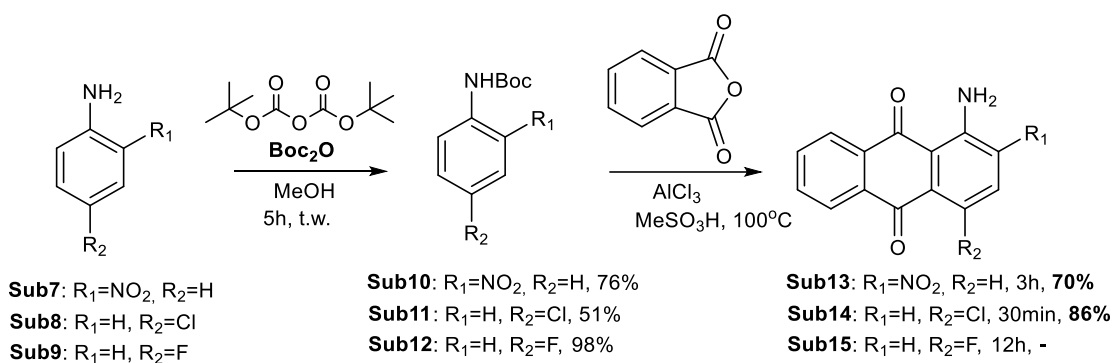
Pierwszą grupą substratów niecukrowych, niezbędnych do otrzymania końcowych glikokoniugatów były pochodne antrachinonów, związków chemicznych należących do rodziny chinonów o trójcyklicznej strukturze, zawierające w pozycjach C-9 i C-10 pierścienia centralnego grupy ketonowe. Związki te można funkcjonalizować przez wprowadzenie do ich struktury różnego rodzaju podstawników, takich jak grupy hydroksylowe, aminowe itd. [89]. Jedną z pochodnych antrachinonu, który postanowiono wykorzystać w reakcjach była purpuryna – 1,2,4-trihydroksyantrachinon, czerwony barwnik występujący naturalnie w korzeniach *Rubia cordifolia*. Związek ten posiada 3 grupy hydroksylowe, z których dwie – zlokalizowane przy atomach węgla C-1 i C-4 zaangażowane są w tworzenie wiązań wodorowych z sąsiadującymi grupami karbonylowymi, co wpływa na obniżenie ich reaktywności, dzięki czemu najbardziej reaktywną grupą hydroksylową jest grupa 2-OH [90]. Przeprowadzono reakcję **Sub4** z 2-bromoetanołem lub 3-bromopropanołem, w obecności DBU w temperaturze 70 °C, zgodnie z procedurą opisaną w literaturze przez Budnioka [91], otrzymując 2-hydroksyalkoksyłową pochodną purpuryny (**Schemat 16**). Zastosowanie DBU jako czynnika deprotonującego miało na celu wygenerowanie anionu purpuryny.



Schemat 16. Synteza 2-hydroksyalkoksyłowych pochodnych purpuryny **Sub5** i **Sub6** (na podstawie [91]).

Otrzymano 1,4-dihydroksy-2-(3-hydroksyetoksy)-antrachinon (**Sub5**) i 1,4-dihydroksy-2-(3-hydroksypropyloksy)antrachinon (**Sub6**) w postaci czerwonego osadu, z wydajnościami odpowiednio 62% i 55%. Tak niska wydajność może wynikać z występowania efektu tautomerycznego i związanych z tym reakcji ubocznych grup hydroksylowych zlokalizowanych na atomach węgla C-1 i C-4.

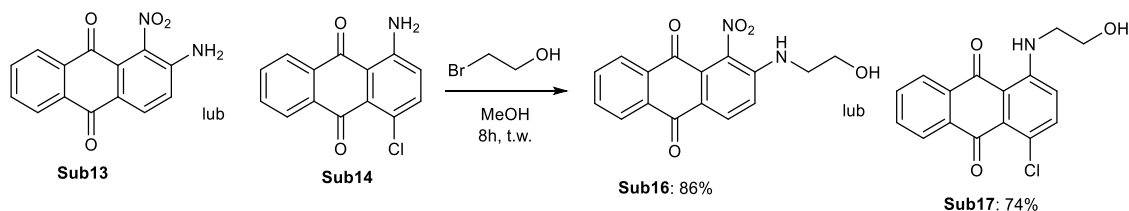
Drugą grupą pochodnych antrachinonów, które otrzymano były *N*-hydroksyalkilowe pochodne antrachinonów, otrzymane z funkcjonalizowanej aniliny. Pochodne otrzymano w reakcji wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji połączonej z reakcją Friedla-Craftsa [92]. Reakcja ta biegnie z utworzeniem odpowiedniej pochodnej kwasu 2-benzoilo-benzoilowego z bezwodnika ftalowego i pochodnej aniliny, w obecności chlorku glinu (AlCl₃) jako katalizatora. Następnie otrzymany kwas aromatyczny ulega wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji w warunkach katalizy kwasowej (w kwasie metanosulfonowym MeSO₃H) dając odpowiednio funkcjonalizowaną pochodną antrachinonu. Głównymi zaletami tej metody jest możliwość otrzymania pochodnej antrachinonu w warunkach *one-pot*, z dobrą wydajnością i w krótkim czasie. W pierwszym kroku 2-nitroanilinę (**Sub7**) poddano reakcji z bezwodnikiem ftalowym, w obecności AlCl₃, w MeSO₃H w temperaturze 100 °C. Wykonana po 1 godz. analiza TLC wykazała obecność w mieszaninie reakcyjnej dużej liczby produktów, co prawdopodobnie mogło wynikać z obecności wolnej grupy aminowej w **Sub7**. Dlatego też postanowiono zabezpieczyć grupę aminową w pochodnej aniliny zabezpieczeniem *tert*-butyloksykarbonylowym (Boc) (**Schemat 17**). Reakcję 2-nitroaniliny (**Sub7**) z diwęglanem di-*tert*-butylu (Boc₂O) przeprowadzono w bezwodnym metanolu, w temperaturze wrzenia. [93]. Po 5h reakcji obserwując całkowite przereagowanie substratu otrzymano *N*-(2-nitrofenylo)karbaminian *tert*-butylu (**Sub10**) z wydajnością 76%, w postaci pomarańczowego osadu. W analogicznych warunkach przeprowadzono reakcje z 4-chloroaniliną (**Sub8**) oraz 4-fluoroaniliną (**Sub9**) otrzymując *N*-(4-chlorofenylo)karbaminian *tert*-butylu (**Sub11**) i *N*-(4-fluorofenylo)karbaminian *tert*-butylu (**Sub12**) z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 51% i 98%. Otrzymane zabezpieczone pochodne aniliny zastosowano do otrzymania kolejnych pochodnych antrachinonu w reakcji Friedla-Craftsa z bezwodnikiem ftalowym w MeSO₃H, w obecności AlCl₃ jako katalizatora, w temperaturze 100 °C (**Schemat 17**).



Schemat 17. Synteza aminowych pochodnych antrachinonów w warunkach reakcji Friedla-Craftsa (na podstawie [92,93]).

W przypadku reakcji z nitropochodną aniliny (**Sub10**) całkowite przereagowanie substratu zaobserwowano po 3 godz. prowadzenia reakcji, natomiast w przypadku chloropochodnej (**Sub14**) już po 30min. Z kolei w przypadku fluoropochodnej (**Sub12**) nie zaobserwowano postępu reakcji nawet po jej wydłużeniu do 12 godz., dlatego reakcję zakończono. Pochodne **Sub13** i **Sub14** otrzymano z dobrymi wydajnościami, odpowiednio 70% i 86%.

W następnym etapie przystąpiono do syntezy *N*-hydroksyalkilowych pochodnych uprzednio otrzymanych antrachinonów **Sub13** i **Sub14** w reakcji z bromoetanolem (**Schemat 18**) [94]. Reakcje prowadzono w bezwodnym MeOH, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, w atmosferze argonu. Produkty wydzielono z mieszaniny reakcyjnej metodą strącania eterem dietylowym. Otrzymano produkty **Sub16** i **Sub17** z wydajnościami odpowiednio 86% i 74%.



Schemat 18. Synteza *N*-hydroksyalkilowych pochodnych antrachinonów (na podstawie [94]).

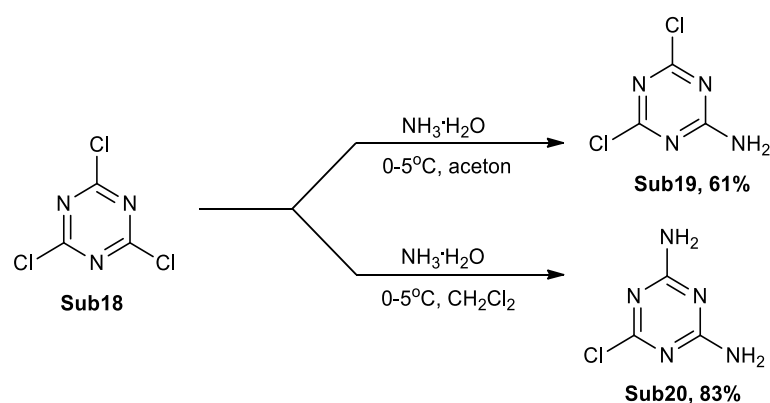
Struktury otrzymanych produktów **Sub5**, **Sub6**, **Sub13-17** potwierdzono analizą widm ¹H NMR oraz ¹³C NMR. Dla **Sub5**, pochodnej purpuryny na widmie węglowym

zaobserwowano sygnały przy przesunięciach 186.92 i 185.93 ppm pochodzące od węgla karbonylowych oraz w zakresie aromatycznym pochodzące od atomów węgla purpuryny, jak również sygnały o przesunięciach 69.87 i 60.91 ppm potwierdzające obecność łańcucha hydroksyetoksylowego. Dla **Sub16**, pochodnej antrachinonu charakterystyczna była obecność na widmie węglowym, oprócz sygnałów w zakresie aromatycznym pochodzących od atomów węgla purpuryny oraz sygnałów pochodzących od węgla karbonylowych (przy przesunięciach 182.28 i 182.15 ppm), jak również sygnałów o przesunięciach 62.80 ppm i 35.97 ppm potwierdzających obecność łańcucha hydroksyetylowego. Dodatkowym potwierdzeniem otrzymania pożądanych struktur było wyznaczenie metodą ESI(MS) mas cząsteczkowych. Struktury pozostałych pochodnych potwierdzono w podobny sposób.

3.2.2. Otrzymywanie pochodnych 1,3,5-triazyny

Następną grupą pochodnych aromatycznych, były pochodne 1,3,5-triazyny, która jest elementem strukturalnym barwników triazynowych np. w Cibacron Blue 3GA.

Ten etap prac rozpoczęto od otrzymania aminowych pochodnych 1,3,5-triazyny wychodząc z 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (chlorku cyjanurowego) (**Sub18**). Związek ten w swojej strukturze zawiera trzy równocenne, łatwopodstawialne atomy chloru. Pochodne **Sub19** i **Sub20** otrzymano w reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej, w której atomy chloru w chlorku cyjanurowym podstawiono grupami aminowymi w reakcji z wodą amoniakalną ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) [95].



Schemat 19. Synteza I-rzędowych aminopochodnych 1,3,5-triazyny **Sub19** i **Sub20** (na podstawie [95]).

Kontrola stopnia podstawienia atomów chloru 1,3,5-triazyny polegała na zastosowaniu odpowiedniej proporcji reagentów, jak również reżimu temperaturowego, dzięki czemu otrzymano zarówno mono- (**Sub19**) jak i diaminopodstawioną pochodną 1,3,5-triazyny (**Sub20**) (**Schemat 19**).

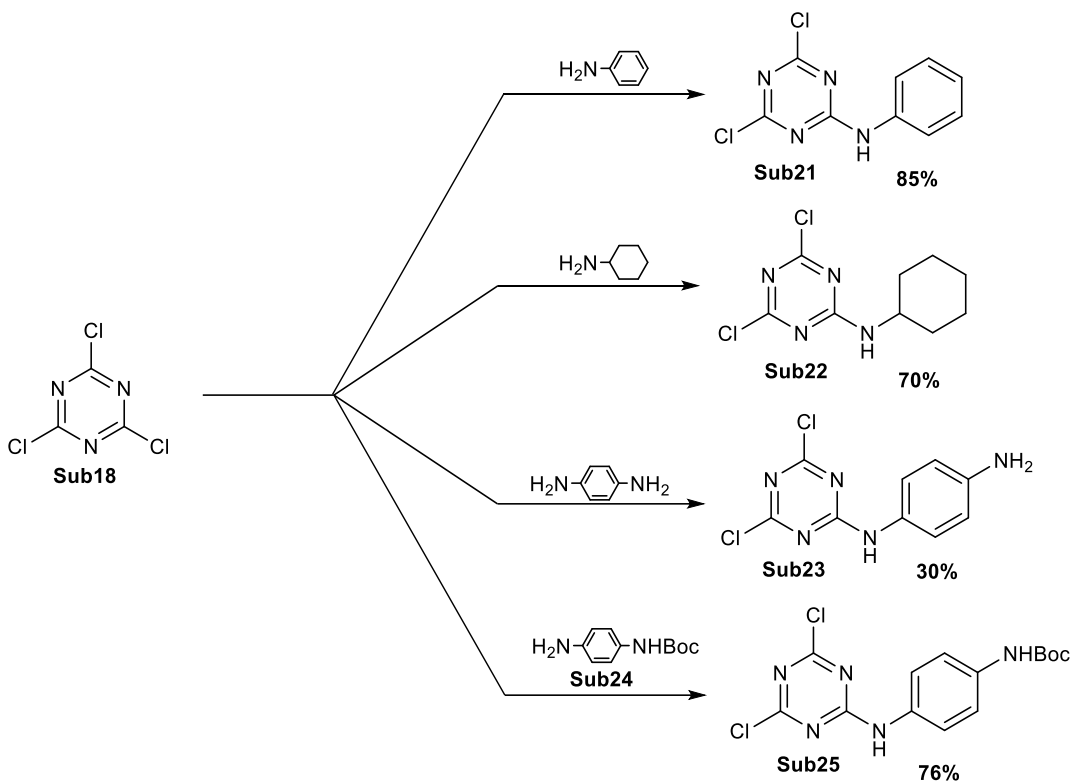
Aby otrzymać 2-amino-4,6-dichloro-1,3,5-triazynę (**Sub19**) reakcję prowadzono z udziałem 1.0 ekw. wody amoniakalnej (w odniesieniu do chlorku cyjanurowego) w acetonie, w zakresie temperatur 0 – 5 °C [95]. Po 1,5 godz. prowadzenia reakcji z mieszaniny reakcyjnej wypadł biały osad produktu, który odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem i rekrystalizowano z wody, a następnie liofilizowano otrzymując produkt **Sub19** wydajnością 61%.

Ze względu na niezadawalającą wydajność produktu postanowiono sprawdzić czy zmiana rozpuszczalnika wpłynie na jej poprawę. W tym celu reakcję przeprowadzono powtórnie w podobnych warunkach, jednak tym razem jako rozpuszczalnik zastosowano chlorek metylenu. W tym przypadku otrzymano trudną do przesączenia zawiesinę, którą w końcu zdecydowano się zatężyć pod zmniejszonym ciśnieniem i oczyścić metodą chromatografii kolumnowej. Otrzymano produkt **Sub19** z bardzo dobrą wydajnością wynoszącą 88%. W analogicznych warunkach przeprowadzono reakcję otrzymywania 4,6-diamino-2-chloro-1,3,5-triazyny (**Sub20**) stosując w tym przypadku 2.0 ekw. wody amoniakalnej. Pożądany produkt otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 83%, którego strukturę potwierdzono analizą widm ¹H oraz ¹³C NMR.

Następnie przystąpiono do otrzymania kolejnej grupy pochodnych aromatycznych, którymi były *N*-podstawione pochodne 1,3,5-triazyny (**schemat 20**).

Kolejne modyfikacje 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny z udziałem I rzędowych amin prowadzące do otrzymania mono podstawionych pochodnych przeprowadzono w oparciu o metody opisane w literaturze. Metody te w zależności od rodzaju aminy różniły się między sobą głównie rodzajem użytej zasady oraz rozpuszczalnikiem. Reakcję 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (**Sub18**) z aniliną prowadzono w acetonie, w temperaturze 5 °C, z dodatkiem wodnego roztworu NaOH [96]. Po 1.5 godz. zaobserwowano całkowite przereagowanie chlorku cyjanurowego i po usunięciu rozpuszczalnika organicznego z mieszaniny reakcyjnej wypadł żółty osad, który odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto zimną wodą i liofilizowano. Analiza danych spektroskopowych

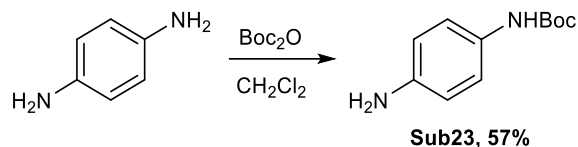
^1H , ^{13}C NMR oraz ESI(MS) wykazała, że otrzymany osad był pożądanym produktem – 2,4-dichloro-6-fenylamino-1,3,5-triazyną (**Sub21**), którego wydajność wyniosła 85%.



Schemat 20. Synteza I-rzędowych aminopochodnych 1,3,5-triazyny **Sub21**, **Sub22**, **Sub23** i **Sub25** (na podstawie [96–99]).

Następnie przeprowadzono reakcję **Sub18** z cykloheksyloaminą (**schemat 20**), w której jako zasadę zastosowano diizopropyletyloaminę, a reakcję prowadzono w chlorku metylenu, w temperaturze 5 °C przez 2 godz. [97]. Po oczyszczeniu metodą chromatografii kolumnowej, otrzymano 2,4-dichloro-6-cykloheksyloamino-1,3,5-triazynę (**Sub22**), w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 70%. W kolejnym eksperymencie chlorek cyjanurowy poddano reakcji z *p*-fenylenodiaminą w THF, w temperaturze 5 °C, z dodatkiem wyprażonego i roztartego NaHCO_3 [98]. Reakcję tę prowadzono przez 1 godz., po czym zaobserwowano całkowite przereagowanie substratu. Pożądany produkt 6-(4-aminofenylamino)-2,4-dichloro-1,3,5-triazynę (**Sub23**) otrzymano z niską wydajnością 30% (strukturę produktu potwierdzono analizą widm ^1H i ^{13}C NMR). Mimo zastosowania substratów w równomolowej ilości oraz niskiej temperatury otrzymano złożoną mieszaninę produktów, co mogło być efektem

obecności dwóch równocennych grup aminowych w *p*-fenylenodiaminie. Zdecydowano się na powtórzenie tej reakcji, jednak po uprzednim zabezpieczeniu jednej z grup aminowych ugrupowaniem Boc (**schemat 21**).

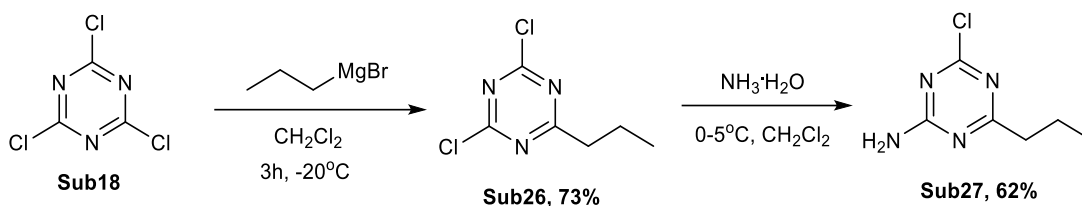


Schemat 21. Reakcja protekcji grupy aminowej *p*-fenylenodiaminy (na podstawie [99]).

W celu selektywnego zabezpieczenia jednej z grup aminowych zastosowano procedurę opisaną przez Lee [99], według której *p*-fenylenodiaminę poddano reakcji z Boc₂O w chlorku metylenu. Reakcję prowadzono w atmosferze argonu, w temperaturze 5 °C przez 4 godz. Zastosowana równomolowa ilość reagentów miała zapewnić reakcję z jedną grupą aminową *p*-fenylenodiaminy. Po rozdzieleniu mieszaniny reakcyjnej na kolumnie chromatograficznej, otrzymano pożądaną *N*-Boc-4-fenylenodiaminę (**Sub24**) z wydajnością 57%, w postaci pomarańczowego ciała stałego. Następnie pochodną **Sub24** poddano reakcji z chlorkiem cyjanurowym, w obecności NaHCO₃, w warunkach reakcji analogicznych jak dla reakcji z udziałem *p*-fenylenodiaminy (**schemat 20**). Po rozdzieleniu mieszaniny reakcyjnej metodą chromatografii kolumnowej otrzymano produkt 6-(4-*N*-Boc-fenylenoamino)-2,4-dichloro-1,3,5-triazynę (**Sub25**) ze znacznie wyższą wydajnością 76%, w postaci białego ciała stałego.

Następnie otrzymano pochodną, którą była alifatyczna pochodna 2,4-dichloro-1,3,5-triazyny (**Sub26**), posiadająca jeden podstawnik alifatyczny w pierścieniu triazyny. Pochodną tę otrzymano w warunkach reakcji Grignarda (**schemat 22**). [100].

Bromek propylomagnezowy otrzymano w standardowych warunkach reakcji Grignarda z 1-bromopropanu, wiórków magnezu wobec katalitycznych ilości jodu w eterze dietylowym. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej, w atmosferze gazu inertnego, w celu zachowania bezwodnych i beztlenowych warunków reakcji.



Schemat 22. Synteza pochodnych 1,3,5-triazyny **Sub26** i **Sub27** (na podstawie [101]).

Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania magnezu otrzymany bromek propylomagnezowy natychmiast wkroplono do roztworu 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (**Sub18**) w chlorku metylenu, uprzednio schłodzonego do temperatury -20°C (**schemat 22**) [101]. Po 4 godz. stwierdzono całkowite przereagowanie chlorku cyjanurowego, reakcję zakończono przez dodanie do układu reakcyjnego wody i ogrzanie mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej. Produkt wydzielono ekstrahując mieszaninę reakcyjną chlorkiem metylenu. 2,4-Dichloro-6-propylo-1,3,5-triazynę (**Sub26**) otrzymano z wydajnością 73%, w postaci żółtego krzepnącego oleju. Następnie pochodną **Sub26** poddano reakcji z wodnym roztworem amoniaku w warunkach reakcji analogicznych jak dla reakcji z **Sub19** i **Sub20** (**schemat 19**). Po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej otrzymano produkt **Sub27** z wydajnością 62%.

Analiza widm ^1H NMR i ^{13}C NMR potwierdziła struktury otrzymanych produktów **Sub19-Sub23**, **Sub25-Sub7**. Dla **Sub19** charakterystyczna była obecność na widmie protonowym poszerzonego singletu przy 5.86 ppm pochodząca od grupy $-\text{NH}_2$, jak również sygnałów na widmie węglowym o przesunięciach 173.23 ppm oraz 171.1 ppm pochodzących od atomów węgla 1,3,5-triazyny. W przypadku pochodnej **Sub26** na widmie węglowym zaobserwowano dodatkowe sygnały o przesunięciach 40.68 ppm, 21.10 ppm oraz 13.89 ppm pochodzące od łańcucha propylowego. Spektrometria ESI(MS) potwierdziła masę cząsteczkową otrzymanego związku. Struktury pozostałych struktur potwierdzono w analogiczny sposób.

3.2.3 Azydopochodne 1,2,4-triazolu

W kolejnym etapie pracy badawczej skupiono się na otrzymaniu 3-azydopochodnych 1,2,4-triazoli, niezbędnych do ich późniejszego skoniugowania

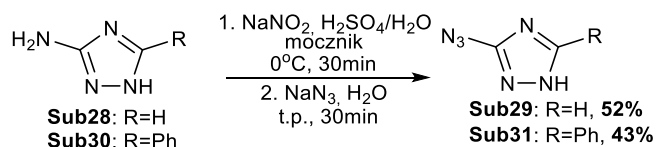
z propargilowymi pochodnymi cukrów w warunkach reakcji *click chemistry*. Ich dodatkową funkcją biologiczną jest możliwość tworzenia dodatkowych oddziaływań wodorowych poprawiających wiązanie się z białkami, a także podobnie jak w przypadku pochodnych oksadiazolu, struktury te mogą również być izosterami ugrupowania difosforanowego.

Pierwszą procedurą, którą zastosowano była dwuetapowa reakcja w warunkach *one-pot* [102]. W pierwszym etapie 3-amino-1*H*-1,2,4-triazol (**Sub28**) poddano 30 minutowej reakcji z azotanem(III) sodu (NaNO₂), w temperaturze 0 °C w 20% roztworze kwasu solnego, a następnie do mieszaniny reakcyjnej w temperaturze pokojowej dodano NaN₃ (**schemat 23**). Analiza TLC wykonana po 1h od dodania NaN₃ wykazała otrzymanie skomplikowanej mieszaniny produktów, trudnych do rozdzielania.



Schemat 23. Reakcja otrzymywania **Sub29** (na podstawie [102]).

W drugim podejściu w miejsce roztworu kwasu solnego zastosowano 20% roztwór kwasu siarkowego(VI) [103]. W tej próbie po utworzeniu soli diazoniowej, w celu rozłożenia powstającego w reakcji kwasu azotowego(III), do mieszaniny reakcyjnej dodano niewielką ilość mocznika, a następnie NaN₃. Po 1h, zaobserwowano całkowite przereagowanie substratu **Sub28**, reakcję zakończono przez doprowadzenie odczynu mieszaniny reakcyjnej do pH=5-6 wodnym roztworem NaHCO₃. Produkt po ekstrakcji octanem etylu krystalizowano z toluenu otrzymując 3-azydo-1*H*-1,2,4-triazol (**Sub29**) w postaci jasnożółtych kryształów, z wydajnością 40%. Zmiana sposobu wydzielania na chromatografię kolumnową pozwoliła na otrzymanie produktu z nieco wyższą wydajnością wynoszącą 52%.



Schemat 24. Reakcja otrzymywania **Sub29** i **Sub31** (na podstawie [103]).

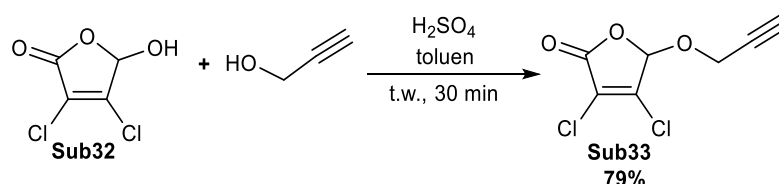
W tych samych warunkach otrzymano 3-azydo-5-fenyl-1*H*-1,2,4-triazol (**Sub31**) z wydajnością 43% (**Schemat 24**).

Struktury otrzymanych produktów **Sub29**, **Sub31** potwierdzono analizą widm ¹H NMR oraz ¹³C NMR. Dla **Sub31** charakterystyczna była obecność na widmie węglowym sygnału 157.53 ppm, pochodzącego od węgla C-3 pierścienia 1,2,4-triazolu, 154.96 ppm pochodzącego od węgla C-5 pierścienia 1,2,4-triazolu oraz sygnałów w zakresie 126.03-130.79 ppm pochodzących od pierścienia fenylowego. Strukturę **Sub29** potwierdzono w analogiczny sposób. Dodatkowym potwierdzeniem otrzymania pożądanych struktur było wyznaczenie mas cząsteczkowych metodą ESI(MS).

3.2.4. Pochodne furan-2(5*H*)-onu i 2*H*-pirol-2-onu

W tej części pracy badawczej skupiono się na otrzymaniu pochodnych furan-2(5*H*)-onu i 2*H*-pirol-2-onu, zawierających ugrupowanie propargilowe umożliwiające ich późniejsze połączenie z pochodnymi cukrów w warunkach reakcji *click chemistry*.

Pierwszym modelem była pochodna furan-2(5*H*)-onu, którą otrzymano w reakcji 3,4-dichloro-5-hydroksy-furan-2(5*H*)-onu (kwasu 3,4-dichloromukowego, **Sub32**) z alkoholem propargilowym (**schemat 25**).

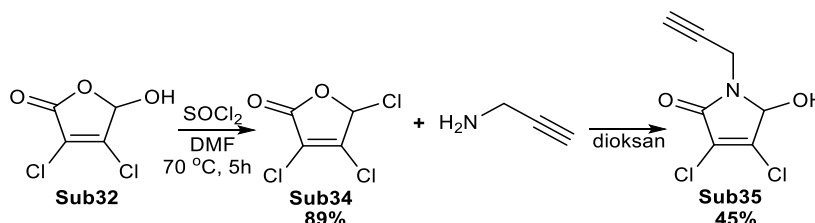


Schemat 25. Reakcja otrzymywania **Sub33** (na podstawie [104]).

Reakcję tę prowadzono we wrzącym toluenie w obecności katalitycznych ilości kwasu siarkowego(VI). Po 30 min nastąpiło całkowite przereagowanie **Sub32**, reakcję zakończono przez dodanie wodnego roztworu NaHCO₃. Po rozdzieleniu mieszaniny reakcyjnej otrzymano 3,4-dichloro-5-propargiloksyfuran-2(5*H*)-on (**Sub33**), jako bezbarwny olej z dobrą wydajnością 79%.

Pochodną 2*H*-pirol-2-onu otrzymano w dwuetapowej reakcji. **Sub32** ogrzewany z SOCl₂ w roztworze DMF tworzy 3,4,5-trichlorofuran-2(5*H*)-on (**Sub34**) z wyd. 89%

(schemat 26). W drugim etapie **Sub34** poddano reakcji z propargiloaminą w dioksanie [40]. Po 24 godzinach reakcji w temperaturze pokojowej nastąpiło całkowite przereagowanie substratu, mieszaninę poreakcyjną dodano do zimnego wodnego roztworu NH_4Cl . Ekstrakcja octanem etylu i oczyszczanie na kolumnie chromatograficznej, dało 3,4-dichloro-5-hydroksy-1-propargilo-1*H*-pirol-2(5*H*)-on (**Sub35**) z wydajnością 45%.



Schemat 26. Reakcja otrzymywania **Sub34** i **Sub35** (na podstawie [104,105]).

Struktury otrzymanych produktów **Sub33-Sub35** potwierdzono analizą widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Dla **Sub33** obecność na widmie protonowym singletu przy 6.06 ppm, wskazywała na obecność H-5 pierścienia furan-2(5*H*)-onu, a tryplet przy 2.64 ppm oraz multipletu 4.51-4.53 ppm pochodziła od ugrupowania propargilowego. W przypadku **Sub34** na widmie protonowym zaobserwowano jedynie sygnał przy 6.53 ppm potwierdzający obecność protonu H-5 pierścienia furan-2(5*H*)-onu. Z kolei dla **Sub35** zaobserwowano dublet przy 5.47 ppm świadczący o obecności atomu wodoru H-5 pierścienia 2*H*-pirol-2-onu, jak również sygnały przy 4.32 ppm, 3.95 ppm i 3.26 ppm świadczące o obecności ugrupowania propargilowego. Dodatkowym potwierdzeniem otrzymania pożądaných struktur było wyznaczenie mas cząsteczkowych otrzymaných metodą ESI(MS).

3.3. Otrzymywanie glikozydów oraz glikokoniugatów pochodnych cukrów

Jak wspomiano wcześniej pochodne mające stanowić mimetyki stanu przejściowego FUTs zawierają w swojej budowie pierścień L-fukozy o konformacji półkrzesłowej przypominający substrat podczas stanu przejściowego reakcji enzymatycznej.

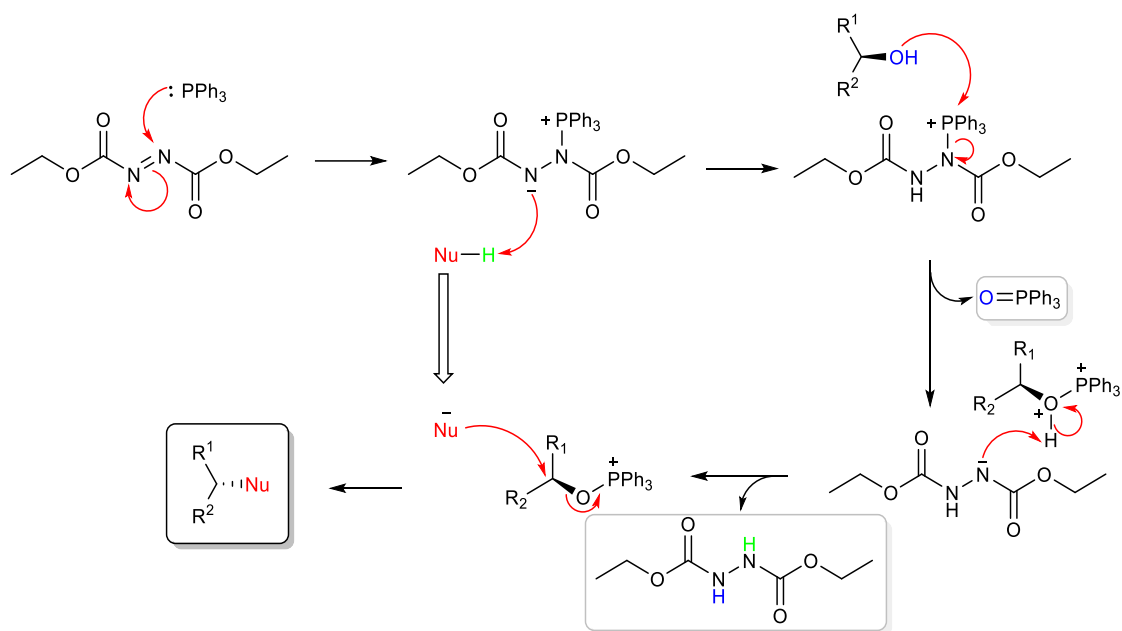
W związku z tym pierwszą grupą pochodnych jaką postanowiono otrzymać były alkoksylowe pseudoglikale L-ramnozy i L-fukozy. Następnie otrzymano pseudoglikale skoniugowane z pochodnymi antrachinonów oraz triazyn, jako struktury z jednej strony przypominające stan przejściowy reakcji enzymatycznej, a z drugiej zawierające w swojej strukturze fragmenty barwników triazynowych.

W kolejnym etapie pracy badawczej otrzymano 2-jodo- i 2-fluoropochodne cukrów połączone z pochodnymi tiadiazoli i triazoli. Pochodne te zostały zaprojektowane jako analogi substratu FUT8, jednocześnie przypominając ugrupowanie fosforanowe. Następną grupą pochodnych stanowiły pochodne furan-2(5*H*)-onu i 2*H*-pirol-2-onu połączone z fragmentem cukrowym poprzez linker 1,2,3-triazolowy. Te struktury zostały zaprojektowane jako izostery ugrupowania fosforanowego [65]. Na koniec otrzymano pseudoglikale, które skoniugowane zostały z pochodnymi heteroaromatycznymi. Te struktury zostały zaprojektowane w taki sposób, aby oprócz przypominania stanu przejściowego posiadać cechy pozwalające na naśladowanie ugrupowania fosforanowego.

3.3.1. Alkoksylowe pochodne pseudoglikali L-ramnozy i L-fukozy

Pierwszą grupą mimetyków stanu przejściowego glikozylotransferaz, były alkoksylowe 2,3-nienasycone pochodne L-fukozy oraz L-ramnozy, które otrzymano wychodząc z L-ramnalu w warunkach przegrupowania Ferriera. Wybór jednostki cukrowej nie był przypadkowy, zaproponowane monosacharydy przypominają jednostkę cukrową naturalnego substratu. Dodatkowo otrzymane w reakcji przegrupowania Ferriera pseudoglikale swoją przestrzenną konformacją półkrzesłową imitują konformację jaką przyjmuje kompleks pośredni w czasie reakcji enzymatycznej.

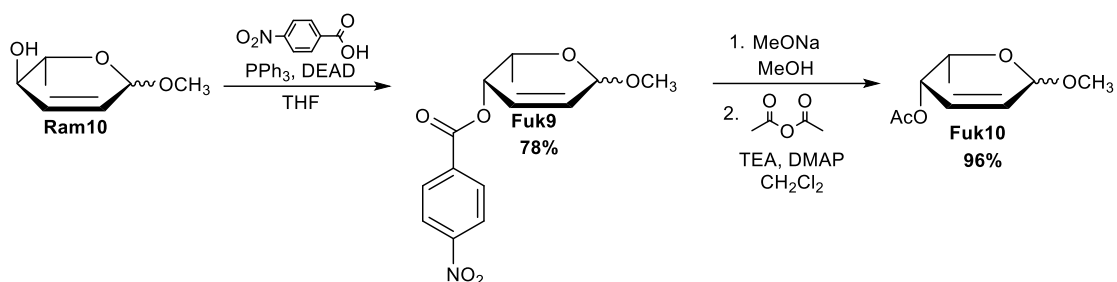
Metoksyłową pochodną **Ram9** otrzymano w reakcji 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**) z metanolem, w bezwodnym acetonitrylu, w temperaturze pokojowej [86]. Najczęściej opisywanym w literaturze kwasem Lewisa stosowanym jako katalizator w tego typu reakcjach jest BF₃·Et₂O, jednak opierając się o wcześniejsze wyniki postanowiono zastosować nieco słabszy katalizator FeCl₃.



Schemat 28. Mechanizm reakcji Mitsunobu^[109].

Istnieje szeroki zakres związków mogących pełnić rolę nukleofili uczestniczących w reakcji Mitsunobu, takie jak kwasy karboksylowe, fenole, imidy, sulfonamidy i tiole, pozwalające na utworzenie wiązań C-O, C-S i C-N oraz wiązań C-C ^[107,108]. Sama reakcja Mitsunobu przebiega w łagodnych, zasadniczo obojętnych warunkach, zazwyczaj w temperaturze od 0 °C do temperatury pokojowej, w takich rozpuszczalnikach jak: THF, eter dietylowy, dichlorometan i toluen, czasami stosowane są bardziej polarne rozpuszczalniki, w tym octan etylu, acetonitryl i DMF ^[108].

Pochodną **Fuk9** otrzymano w warunkach reakcji Mitsunobu z **Ram10** i kwasu 4-nitrobenzoesowego w obecności azodikarboksylanu dietylu (DEAD) oraz trifenylofosfiny (PPh₃), w bezwodnym THF, w temperaturze pokojowej (**schemat 29**). Po 2 godz. zanikł całkowicie substrat, reakcję więc zakończono, produkt wydzielono metodą chromatografii kolumnowej otrzymując pochodną L-fukozy – metylo 4-nitrobenzoilo-2,3,6-trideoksy-L-*treo*-heks-2-enopiranozyd (**Fuk9**) z wydajnością 78%, w postaci jasnożółtego ciała stałego, z zachowaniem proporcji anomerów jak dla substratu. W otrzymanej pochodnej **Fuk9** grupę 4-nitrobenzoesową w pozycji C-4 pierścienia cukrowego wymieniono na grupę acetylową **Fuk10**.



Schemat 29. Reakcja otrzymywania **Fuk9** i **Fuk10** (na podstawie [86]).

W podobnych warunkach stosując wyżej opisaną sekwencję reakcji otrzymano inne alkoksypochodne pseudoglikali L-ramnozy (**Ram11-Ram15**) i L-fukozy (**Fuk11-Fuk15**), których wydajności zestawiono w **tabeli 1**.

Tabela 1. Wydajności otrzymanych 2,3-nienasyconych pochodnych L-ramnozy **Ram11-Ram15** i L-fukozy **Fuk11-Fuk15**

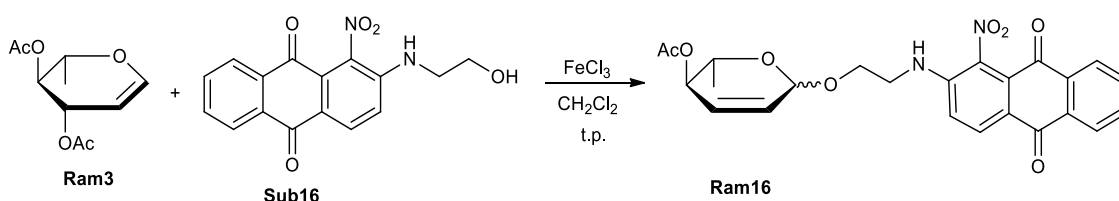
Struktura	Wydajność	$\alpha:\beta$	Struktura	Wydajność	$\alpha:\beta$
	55%	5:1		74%	6:1
	47%	10:1		69%	10:1
	49%	19:1		65%	18:1
	65%	15:1		65%	15:1
	48%	19:1		48%	19:1

Struktury otrzymanych produktów **Ram9**, **Ram11-Ram15**, **Fuk10-Fuk15** potwierdzono analizą widm ¹H NMR oraz ¹³C NMR. Charakterystyczna dla **Ram9** – 2,3-nienasyconej pochodnej L-ramnozy była obecność na widmie protonowym

multipletu w zakresie 5.96-5.76 ppm potwierdzającego obecność wiązania 2,3-nienasyconego w pierścieniu cukrowym. Z kolei dla L-fukozy **Fuk11**, sygnały odpowiadające za obecność wiązania 2,3-nienasyconego obecne były w zakresie 6.04-6.10 ppm. Struktury pozostałych pochodnych potwierdzono przez obecność podobnych sygnałów.

3.3.2. Antrachinonowe pochodne 2,3-nienasyconej L-ramnozy

Wcześniej otrzymane hydroksyalkoksy- i hydroksyalkiloaminopochodne antrachinonu, różniące się pozycją przyłączenia do pierścienia antrachinonu oraz długością łańcucha hydroksyalkilowego wykorzystano w syntezie glikokoniugatów w warunkach reakcji przegrupowania Ferriera. W reakcji 3,4-di-O-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**) z 2-(2-hydroksyetyloamino)-1-nitroantrachinonem (**Sub16**), w obecności FeCl₃, w bezwodnym chlorku metylenu, w temperaturze pokojowej otrzymano [2-(1-nitro-antrachinono)-2-aminoetylo]-4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erytro-heks-2-enopiranozyd (**Ram16**), z wydajnością 72% (schemat 30, tabela 2).

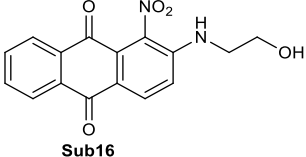
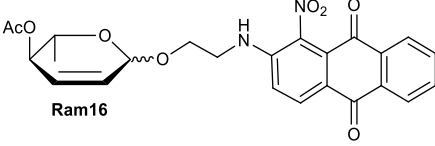
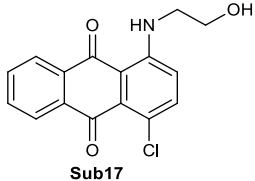
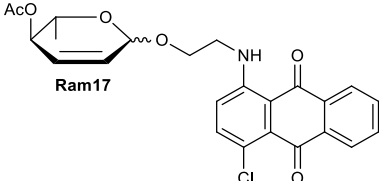
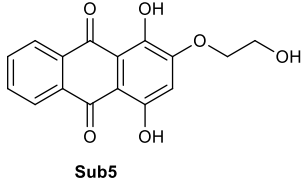
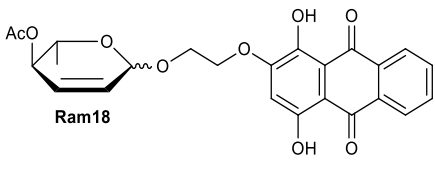
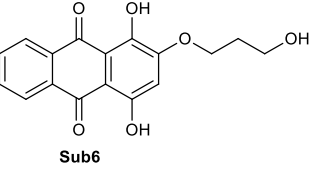
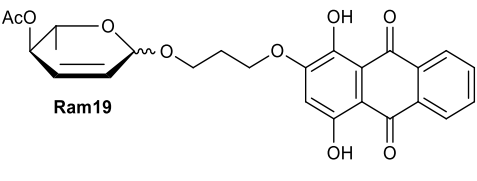


Schemat 30. Reakcja otrzymywania **Ram16** w warunkach reakcji przegrupowania Ferriera (na podstawie [91]).

W analogicznych warunkach przeprowadzono reakcje z pozostałymi hydroksyalkilowymi pochodnymi antrachinonów otrzymując glikokoniugaty **Ram17-Ram19** w postaci mieszaniny anomerów, z przewagą anomeru α .

Tabela 2. Wydajności otrzymanych 2,3-nienasyconych pochodnych L-ramnozy **Ram16-Ram19**

Struktura substratu	Struktura produktu	Wydajność	$\alpha:\beta$
---------------------	--------------------	-----------	----------------

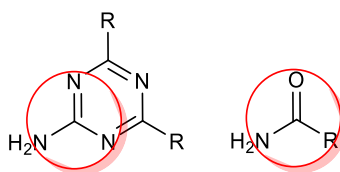
 <p>Sub16</p>	 <p>Ram16</p>	72%	3:1
 <p>Sub17</p>	 <p>Ram17</p>	64%	3:1
 <p>Sub5</p>	 <p>Ram18</p>	38%	3:1
 <p>Sub6</p>	 <p>Ram19</p>	25%	3:1

W reakcjach z pochodnymi purpuryny (**Sub5** i **Sub6**) zaobserwowano pojawianie się dodatkowych produktów ubocznych, które mogły być wynikiem udziału w reakcji pozostałych grup hydroksylowych purpuryny lub podstawienia w pozycji C-3 pierścienia cukrowego, co wpłynęło na obniżenie wydajności produktu głównego. Struktury otrzymanych produktów **Ram16-Ram19** potwierdzono analizą widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Dla pochodnej **Ram16** obecność na widmie protonowym multipletu przy przesunięciu 5.48-5.53 ppm potwierdziła obecność wiązania 2,3-nienasyconego. Dodatkowo obecność multipletów przy przesunięciach 2.30 ppm, 3.48 ppm oraz 4.50 ppm była potwierdzeniem obecności łącznika alifatycznego pochodzącego od pochodnej antrachinonu. Otrzymanie pożądanej struktury potwierdzono również przez wyznaczenie masy cząsteczkowej metodą ESI(MS). Struktury pozostałych pochodnych potwierdzono przez obecność analogicznych sygnałów.

3.3.3. Synteza pseudoglikali 1,3,5-triazyny pochodnych L-ramnozy

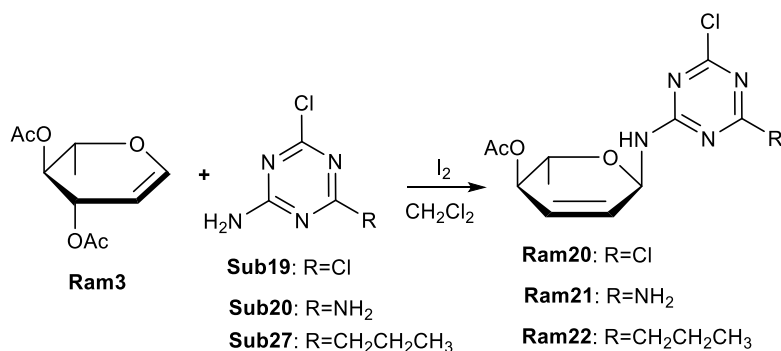
Kolejną grupą związków, były triazynowe glikokoniugaty 2,3-nienasyconej pochodnej L-ramnozy, w syntezie których zastosowano wcześniej otrzymane aminowe

pochodne 1,3,5-triazyny. Glikokoniugaty te również otrzymano w warunkach przegrupowania aza-Ferriera wychodząc z **Ram3**.



Schemat 30. Układ wiązań występujący w pochodnych amidów i 2-amino-1,3,5-triazyn.

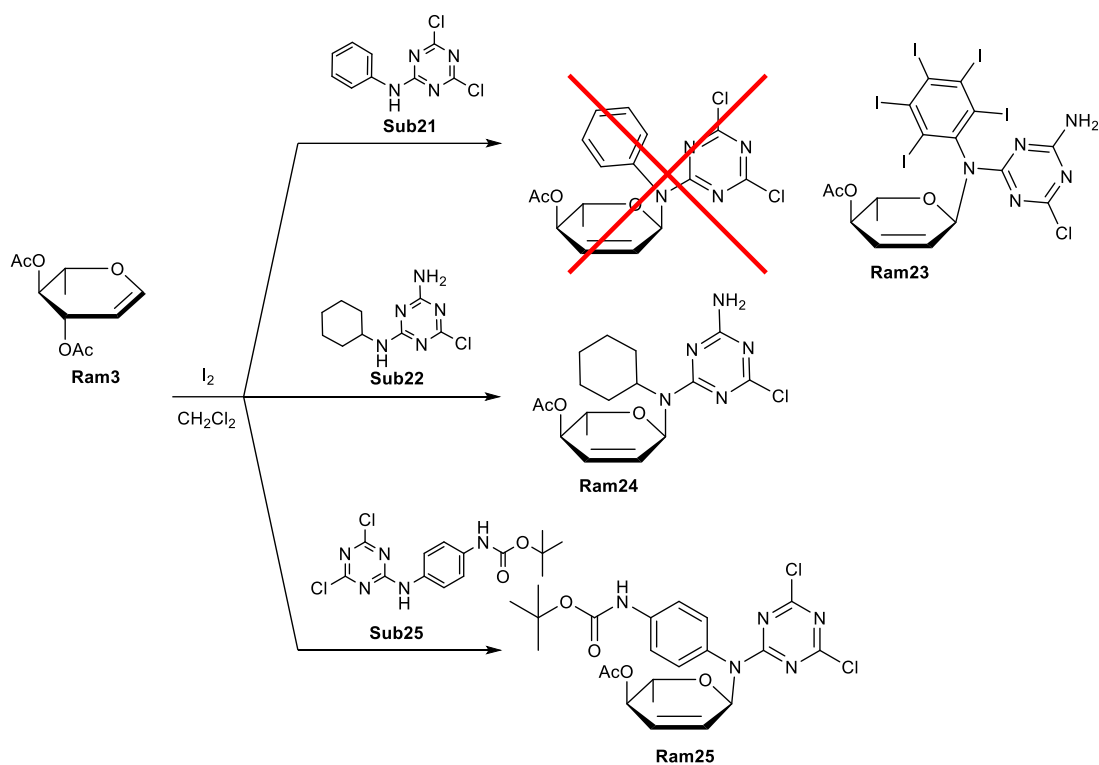
W tej części eksperymentów postanowiono sprawdzić, czy w warunkach reakcji przegrupowania aza-Ferriera, można w miejsce amidu zastosować I- i II-rzędowe aminowe pochodne 1,3,5-triazyny, ze względu na podobieństwo ich układu wiązań do układu występującego w amidach (**schemat 31**). W tym celu w reakcji z **Ram3** zastosowano trzy pierwszorzędowe aminy: 2-amino-4,6-dichloro-1,3,5-triazynę (**Sub19**), 4,6-diamino-2-chloro-1,3,5-triazynę (**Sub20**) oraz 4-amino-2-chloro-6-propylo-1,3,5-triazynę (**Sub27**), w temperaturze pokojowej, w CH_2Cl_2 , w obecności jodu molekularnego jako katalizatora (**Schemat 32**) [110].



Schemat 32. Reakcja otrzymywania **Ram20**, **Ram21** i **Ram22** (na podstawie [110]).

Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania substratu cukrowego reakcję zakończono przez dodanie do mieszaniny wodnego roztworu tiosiarczanu sodu w celu dezaktywacji obecnego w układzie jodu. Produkt wydzielono metodą chromatografii kolumnowej otrzymując pochodne **Ram20**, **Ram21** i **Ram22**, z wydajnościami odpowiednio 53%, 48% i 51% jako anomery α .

Następnie w analogicznych warunkach zbadano reaktywność drugorzędowych amin: 2,4-dichloro-6-fenylamino-1,3,5-triazyny (**Sub21**), 2,4-dichloro-6-cykloheksyloamino-1,3,5-triazyny (**Sub22**) i (4-((4,6-dichloro-1,3,5-triazyn-2-yl)amino)fenyl)karbaminianu *tert*-butylu (**Sub25**) (schemat 33).



Schemat 33. Reakcja otrzymywania **Ram23**, **Ram24** i **Ram25** (na podstawie [110]).

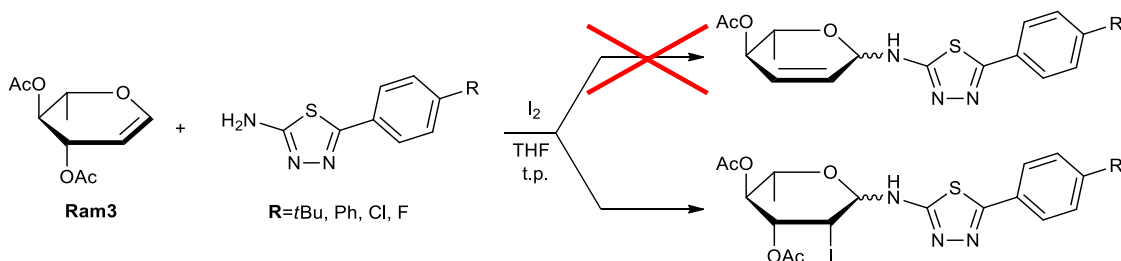
W reakcji L-ramnalu (**Ram3**) z pochodną **Sub21**, w analogicznych warunkach jak w poprzednich eksperymentach. Po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej, analiza ^1H i ^{13}C NMR, jak również MS wykazała, że w reakcji **Ram3** z **Sub21** wszystkie atomy wodoru pierścienia fenylowego uległy podstawieniu atomami jodu, dając 4-*O*-acetylo-1,2,3,6-tetradeoksy-*N*-(2,4-dichloro-1,3,5-triazyn-6-yl)-*N*-(2,3,4,5,6-pentajodo-fenyl)- α -*L*-erythro-heks-2-enopiranozyloaminę (**Ram23**) z wydajnością 46%, jako anomer α . W następnej próbie, w analogicznych warunkach, przeprowadzono reakcję 2,4-dichloro-6-cykloheksyloamino-1,3,5-triazyny (**Sub22**) otrzymując 4-*O*-acetylo-1,2,3,6-tetradeoksy-*N*-cykloheksylo-*N*-(2,4-dichloro-1,3,5-triazyn-6-yl)- α -*L*-erythro-heks-2-enopiranozyloaminę (**Ram24**) z wydajnością 44% jako anomer α .

W wyniku tej reakcji otrzymano również obok produktu głównego szereg produktów ubocznych (prawdopodobnie również produkt podstawienia w miejscu C-3), dlatego postanowiono reakcję powtórzyć w analogicznych warunkach, jednak w obniżonej temperaturze nie przekraczającej -10 °C. Jednak po 24 godz. analiza TLC nie wykazała postępu reakcji, dlatego zdecydowano się ją zakończyć. Natomiast, w przypadku reakcji otrzymywania **Ram25**, otrzymano skomplikowaną mieszaninę produktów, której zdecydowano się nie rozdzielać.

Struktury otrzymanych produktów **Ram20-Ram24** potwierdzono analizą widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Na widmie protonowym zaobserwowano charakterystyczny multiplet przy 6.09-5.94 ppm potwierdzający obecność wiązania 2,3-nienasyconego w pierścieniu cukrowym, natomiast sygnały przy 9.60 ppm oraz 6.15 ppm wskazywały na obecność grup aminowych 1,3,5-triazyny w **Ram21**, należącego do *N*-glikozydowych pseudoglikali. Dodatkowym potwierdzeniem otrzymania pożądanej struktury było wyznaczenie jej masy cząsteczkowej metodą ESI(MS). Widma pozostałych cukrowych pochodnych 1,3,5-triazyny zawierały podobne sygnały diagnostyczne.

3.3.4. 2-deoksy-2-jodo-*N*-glikozydy pochodne tiadiazoli

Mając na uwadze pozytywny rezultat reakcji przegrupowania Ferriera z zastosowaniem pochodnych 1,3,5-triazyny, postanowiono przeprowadzić reakcję L-ramnalu (**Ram3**) i 2-amino-5-((4-*tert*-butylo)fenylo)-1,3,4-tiadiazolu **Sub36** (**schemat34**), w warunkach reakcji przegrupowania aza-Ferriera, w obecności jodu jako katalizatora. Ze względu na trudności w rozpuszczaniu pochodnych tiadiazoli w CH_2Cl_2 , w tych eksperymentach jako rozpuszczalnik zastosowano THF.



Schemat 34. Reakcja 2-amino-tiadiazoli z L-ramnałem, w warunkach reakcji przegrupowania Ferriera (na podstawie [91]).

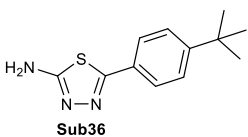
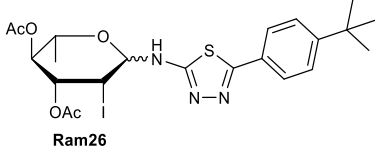
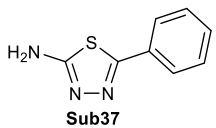
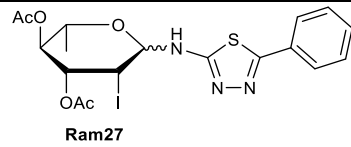
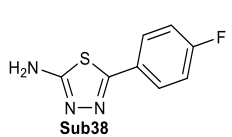
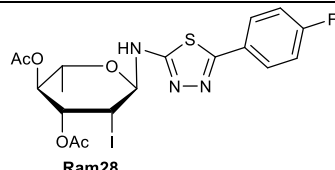
Po 1.5 godz. analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie substratu, rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej, a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Otrzymano produkt reakcji z wydajnością 35%, ale co zaskakujące, nie był to oczekiwany produkt przegrupowania aza-Ferriera. Dokładniejsza analiza widm ^1H i ^{13}C NMR oraz MS wykazała, że wyizolowany produkt powstał w wyniku jodoaminowania 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**) (tabela 3). Sugerując się danymi literaturowymi, wskazującymi że 2-halogenocukry pełnią rolę inhibitorów fukozylotransferaz (^{15,21}), postanowiono otrzymać również inne 2-deoksy-2-jodopochodne cukrów, aby ocenić ich potencjał jako inhibitorów FUT8. W tym celu najpierw zoptymalizowano warunki reakcji, aby otrzymać jak najbardziej efektywną metodę. Optymalizacja polegała na doborze rozpuszczalnika i ilości ekw. jodu (tabela 3). W pierwszej kolejności postanowiono ocenić, czy dojdzie do jakiegokolwiek reakcji w przypadku zmieszania 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**) z 2-amino-5-((4-*tert*-butylo)-fenylo)-1,3,4-tiadiazolem (**Sub36**) w różnych rozpuszczalnikach, przy jednoczesnym braku jodu. W tych warunkach nie zaobserwowano żadnych zmian. W kolejnym doświadczeniu reakcję przeprowadzono w mieszaninie rozpuszczalników o różnej polarności w obecności 1.0 ekw. jodu. W takich warunkach zaobserwowano jedynie śladowe ilości pojawiającego się produktu. Trzeci zestaw doświadczeń przeprowadzono w THF w obecności różnych stężeń jodu, mianowicie 0.5, 1.0 i 2.0 ekw. Otrzymane wyniki wyraźnie wskazywały, że reakcja zachodziła najlepiej w obecności podwójnego molowego nadmiaru jodu cząsteczkowego. Ostatnim eksperymentem była ocena, która z metod jodoaminowania byłaby korzystniejsza. Z tego powodu przetestowano NIS, który standardowo stosowany jest w syntezie 2-deoksy-2-halogenocukrów z glikali. W reakcji tej zaobserwowano jednak pojawianie się innego, dodatkowego produktu w bardzo wysokim stężeniu, co spowodowało, że postanowiono wrócić do metody zakładającej zastosowanie jodu molekularnego.

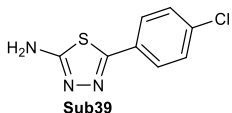
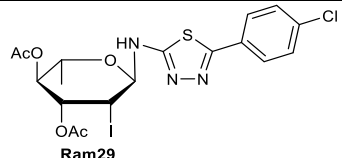
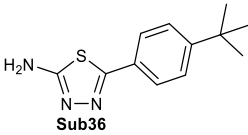
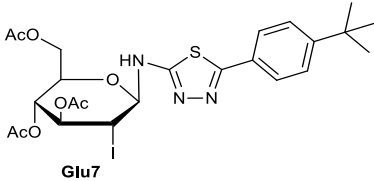
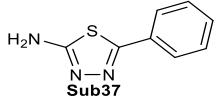
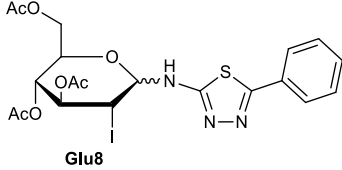
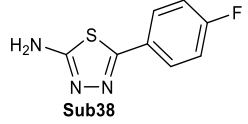
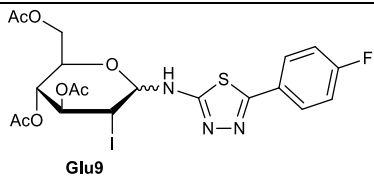
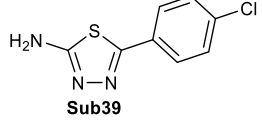
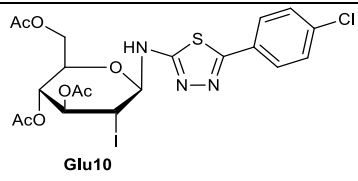
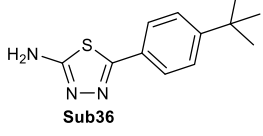
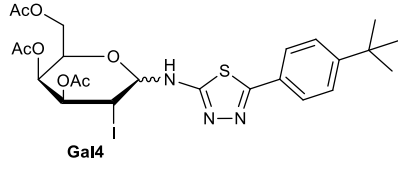
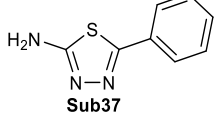
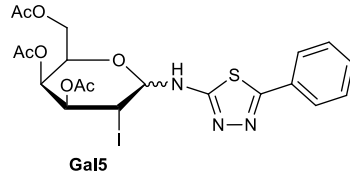
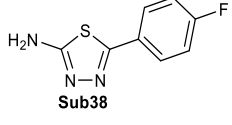
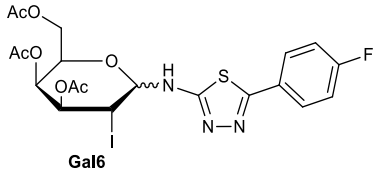
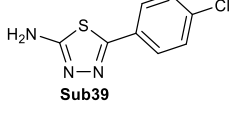
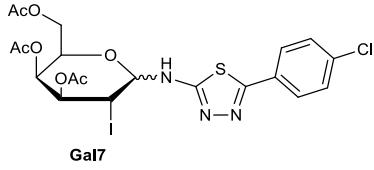
Tabela 3. Optymalizacja warunków reakcji otrzymywania tiadiazolowych pochodnych 2-jodo-L-ramnozy .

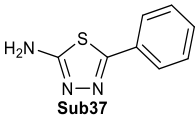
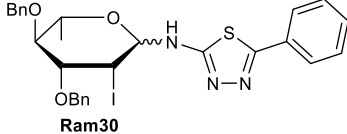
Rozpuszczalnik	Katalizator	Wydajność
THF	-	-
CH ₂ Cl ₂ /DMF	-	-
CH ₂ Cl ₂ /DMSO	-	-
CH ₂ Cl ₂	1.0 ekw. I ₂	ślady
CH ₂ Cl ₂ /DMF	1.0 ekw. I ₂	Ślady
CH ₂ Cl ₂ /DMSO	1.0 ekw. I ₂	Ślady
THF	0.5 ekw. I ₂	-
THF	1.0 ekw. I ₂	35% ($\alpha:\beta = 1:9$)
THF	2.0 ekw. I ₂	71% ($\alpha:\beta = 1:11$)
THF	2.0 ekw. NIS	30% ($\alpha:\beta = 1:1$)

Wyniki powyższych eksperymentów wskazują, że najlepiej reakcja ta przebiega w bezwodnym THF, w obecności 2.0 ekw. jodu, w temperaturze pokojowej. W takim układzie reakcyjnym przeprowadzono reakcje z pozostałymi 2-amino-1,2,4-tiadiazolami z użyciem różnych glikali (**tabela 4**).

Tabela 4. Wydajności otrzymanych tiadiazolowych pochodnych 2-jodo-L-ramnozy

Glikal	Tiadiazol	Struktura produktu	Wydajność	$\alpha:\beta$
Ram3			71	11:1
Ram3			47	1.7:1
Ram3			55	100:0

Ram3	 Sub39	 Ram29	49	100:1
Glu3	 Sub36	 Glu7	51	100:1
Glu3	 Sub37	 Glu8	68	1:4.4
Glu3	 Sub38	 Glu9	58	1:1.3
Glu3	 Sub39	 Glu10	69	0:100
Gal3	 Sub36	 Gal4	72	2.3:1
Gal3	 Sub37	 Gal5	62	3.8:1
Gal3	 Sub38	 Gal6	45	4:1
Gal3	 Sub39	 Gal7	58	1.4:1

Ram4	 Sub37	 Ram30	42	1:1
-------------	--	---	----	-----

Produkty **Ram24-Ram28**, **Glu7-Glu10** i **Gal4-Gal7** otrzymano z zadowalającymi wydajnościami oraz wysoką α -stereoselektywnością, na co mogła wpłynąć obecność dużego objętościowo atomu jodu na atomie węgla C-2. W wyniku reakcji z pochodnymi **Sub36**, **Sub38** i **Sub39**, oprócz produktu głównego obserwowano pojawianie się również śladowych ilości produktu 2,3-nienasyconego. Na podstawie otrzymanych wyników eksperymentów można stwierdzić, że obecność i charakter podstawnika przyłączonego do pierścienia fenyloвого tiadiazolu może mieć wpływ na rodzaj otrzymanego produktu.

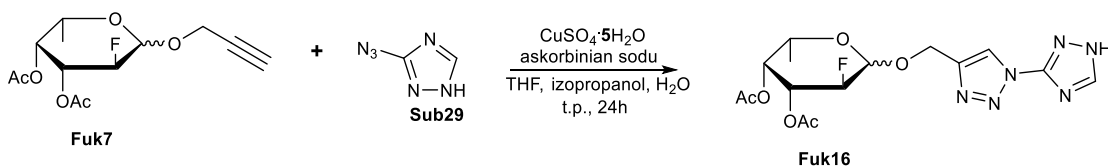
Struktury otrzymanych produktów **Ram26-Ram30**, **Glu7-Glu10** i **Gal4-Gal7** potwierdzono analizą widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Dla **Ram26**, która stanowi pochodną 1,3,4-tiadiazolu, charakterystyczna była obecność na widmie węglowym sygnału przy 81.64 ppm pochodzącego od atomu węgla C-1 pierścienia cukrowego, jak również sygnałów 167.26 ppm i 154.48 ppm będących potwierdzeniem obecności pochodnej tiadiazolu. Dodatkowym potwierdzeniem otrzymania pożądaných struktur było wyznaczenie metodą ESI(MS) mas cząsteczkowych. Struktury pozostałych pochodnych potwierdzono przez obecność podobnych sygnałów.

3.3.5. 2-Deoksy-2-fluoropochodne 1,2,4-triazoli

Kolejną grupą zsyntezowanych związków, były glikokoniugaty 2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozy, do których przyłączono jednostkę 1,2,4-triazolu, w których funkcję linkera pełnił 1,2,3-triazol. Połączenie to uzyskano stosując reakcję cykloaddycji 1,3-dipolarnej w wersji *click chemistry*. Określenie "*click chemistry*" to termin obejmujący wysoce wydajne reakcje umożliwiające tworzenie połączeń między jednostkami budulcowymi. Reakcje tak klasyfikowane powinny zachodzić w łagodnych warunkach, z wysoką chemoselektywnością [111,112]. Pomimo istnienia wielu typów reakcji klasyfikowanych jako "*click chemistry*" najbardziej reprezentatywną pośród nich jest reakcja cykloaddycji 1,3-dipolarnej, azydo-alkinowa katalizowana jonami miedzi (CuAAC) [111]. Katalizatorem w tej reakcji są jony miedzi(I), dlatego jednym

z najważniejszych czynników jest utrzymanie stężenia Cu(I) na wystarczającym poziomie podczas reakcji. W tym celu, często preferowane jest użycie źródła Cu(II) z dodatkiem czynnika redukującego w dużym nadmiarze (najczęściej jest to układ CuSO₄:askorbinian sodu) [111].

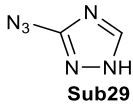
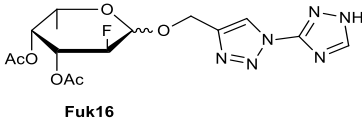
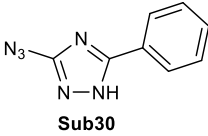
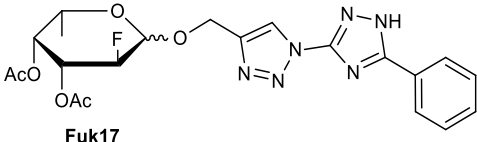
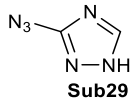
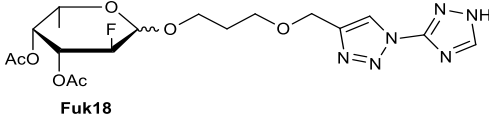
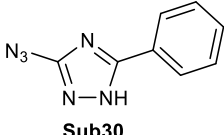
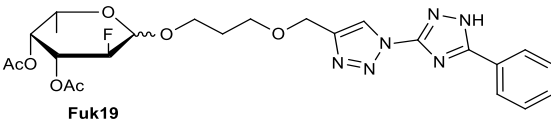
Pochodne w tej części pracy otrzymano w oparciu o procedurę opracowaną przez Taouai [113], według której odpowiednie modele azydkowe koniugowano z pochodnymi propargilowymi, otrzymując glikokoniugaty 1,2,4-triazolu. Reakcję prowadzono w obecności siarczanu miedzi i askorbinianu sodu, w mieszaninie rozpuszczalników izopropanol:THF:H₂O w stosunku objętościowym 1:1:1 (**schemat 35**).



Schemat 35. Reakcja otrzymywania **Fuk16** (na podstawie [113]).

Po zaobserwowaniu zmiany zabarwienia mieszaniny reakcyjnej z żółtej na niebiesko-zieloną czemu towarzyszy zanik substratu **Fuk7** (analiza TLC) reakcję zakończono, a produkt wydzielono metodą chromatografii kolumnowej, otrzymując pożądany produkt 1-[1-(1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]-metyleno-3,4-di-*O*-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-*L*-fukopiranozyd (**Fuk16**), z wydajnością 78% (**tabela 5**), jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1.5:1$. Następnie w tych samych warunkach otrzymano pozostałe glikokoniugaty 1,2,4-triazolu, otrzymując **Fuk17-Fuk19** z dobrymi wydajnościami w zakresie 71%-76% (**tabela 5**).

Tabela 5. Wydajności otrzymanych glikokoniugatów pochodnych 2-deoksy-2-fluoro-L-fukozy **Fuk16-Fuk19**

Struktura substratu	Struktura produktu	Wydajność
 <p>Sub29</p>	 <p>Fuk16</p>	78%
 <p>Sub30</p>	 <p>Fuk17</p>	74%
 <p>Sub29</p>	 <p>Fuk18</p>	76%
 <p>Sub30</p>	 <p>Fuk19</p>	71%

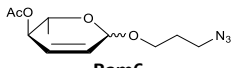
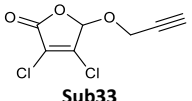
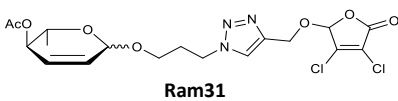
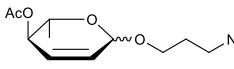
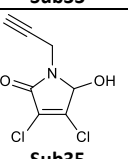
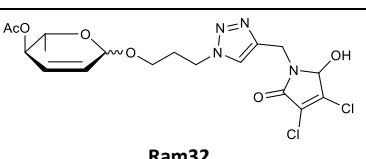
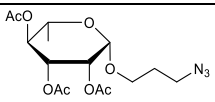
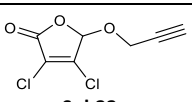
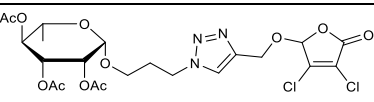
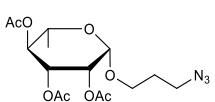
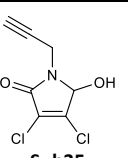
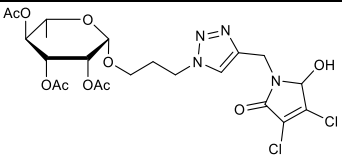
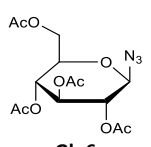
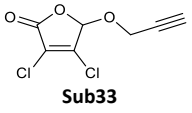
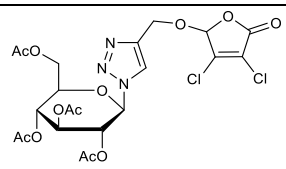
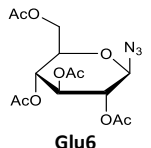
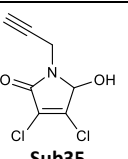
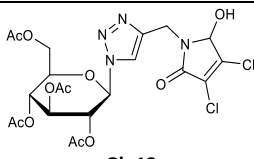
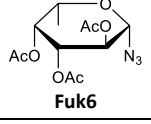
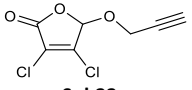
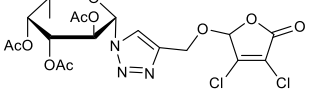
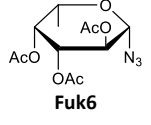
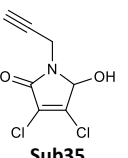
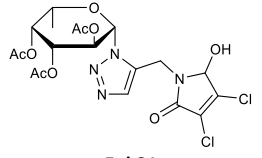
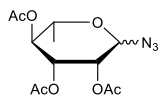
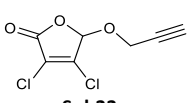
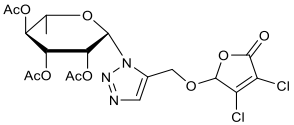
Struktury otrzymanych produktów **Fuk16-Fuk19** potwierdzono analizą widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Dla **Fuk16**, pochodnej 1,2,4-triazolu charakterystyczna była obecność na widmie protonowym singletu przy 4.53 ppm potwierdzającego obecność grupy $-\text{CH}_2-$, która łączy anomeryczny węgiel pierścienia cukrowego z 1,2,3-triazolem. Ponadto sygnały na widmie węglowym 156.76 ppm oraz 150.67 ppm były potwierdzeniem obecności pochodnej 1,2,4-triazolu. Dodatkowym potwierdzeniem otrzymania pożądaných struktur było wyznaczenie metodą ESI(MS) mas cząsteczkowych. Struktury pozostałych pochodnych potwierdzono przez obecność podobnych sygnałów.

3.3.6. Glikokoniugaty pochodne furan-2(5H)-onu i 2H-pirol-2-onu

W tej części syntez postanowiono otrzymać cukrowe pochodne furan-2(5H)-onu i 2H-pirol-2-onu. W tym celu odpowiednie azydki cukrów (**Ram5-Ram8**, **Fuk6** oraz **Glu6**) oraz propargilowe pochodne furan-2(5H)-onu i 2H-pirol-2-onu (**Sub32** oraz **Sub34**) poddano reakcji w obecności katalizatora CuAAC (**tabela 6**). W tych warunkach

otrzymano **Ram31-Ram38**, **Fuk20**, **Fuk21**, **Glu11** oraz **Glu12** z bardzo dobrymi wydajnościami.

Tabela 6. Wydajności otrzymanych glikokoniugatów pochodnych furan-2(5*H*)-onu i 2*H*-pirol-2-onu **Ram31-Ram38**, **Fuk20**, **Fuk21**, **Glu11** oraz **Glu12**.

Glikal	Tiadiazol	Struktura produktu	Wydajność	$\alpha:\beta$
 Ram6	 Sub33	 Ram31	87%	1:6
 Ram6	 Sub35	 Ram32	79%	1:5
 Ram8	 Sub33	 Ram33	92%	0:100
 Ram8	 Sub35	 Ram34	83%	0:100
 Glu6	 Sub33	 Glu11	85%	0:100
 Glu6	 Sub35	 Glu12	75%	0:100
 Fuk6	 Sub33	 Fuk20	78%	0:100
 Fuk6	 Sub35	 Fuk21	68%	0:100
 Ram7	 Sub33	 Ram35	79%	0:100

			71%	1:3
			74%	1:11
			63%	0:100

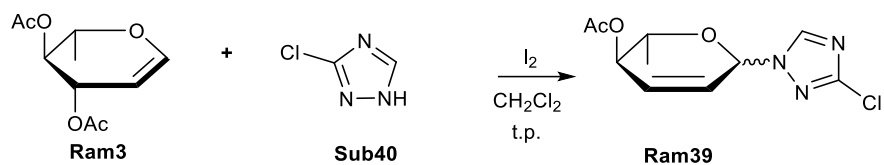
Struktury otrzymanych produktów **Ram31-Ram38**, **Fuk20**, **Fuk21**, **Glu11** oraz **Glu12** potwierdzono analizą widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Dla **Ram31**, pochodnej furan-2(5*H*)-onu, zaobserwowano na widmie protonowym singlet o przesunięciu 5.95 ppm oraz multiplet 4.98-5.01 ppm potwierdzające obecność grupy $-\text{CH}_2-$ łączącej 1,2,3-triazol z jednostką furan-2(5*H*)-onu oraz wodoru H-5 pierścienia furanonowego, jak również obecność sygnałów zarejestrowanych na widmach zastosowanych w reakcji substratów. Dla **Ram32**, pochodnej 2*H*-pirol-2-onu charakterystyczna była, oprócz sygnałów substratów, obecność na widmie protonowym dwóch dubletów przy 4.80 ppm i 4.57 ppm oraz 5.47 ppm, odpowiadających za obecność grupy $-\text{CH}_2-$ łączącej 1,2,3-triazol z jednostką 2*H*-pirol-2-onu oraz wodoru H-5 pierścienia pirol-2-onu. Dodatkowym potwierdzeniem otrzymania pożądaných struktur były masy cząsteczkowe wyznaczone metodą ESI(MS). Struktury pozostałych pochodnych potwierdzono przez obecność podobnych sygnałów.

3.3.7. Azolowe pochodne 2,3-nienasyconej L-ramnozy, otrzymane w wyniku reakcji przegrupowania Ferriera

W oparciu o dane literaturowe [24] [15] [60,63] można stwierdzić, że struktury, w których obecny jest pierścień triazolowy inhibują aktywność FUTs. Z tego powodu w tej części pracy postanowiono sprawdzić, czy 2,3-nienasycone cukrowe pochodne imidazoli i triazoli, bezpośrednio przyłączonych do węgla anomerycznego cukru, również będą aktywne.

Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach pochodne otrzymano w warunkach reakcji przegrupowania aza-Ferriera z udziałem L-ramnalu (**Ram3**)

i 3-chloro-1*H*-1,2,4-triazolu **Sub40**, w obecności jodu jako katalizatora, w temperaturze pokojowej, w bezwodnym chlorku metylenu (**schemat 36**).



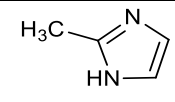
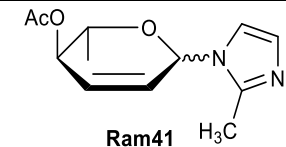
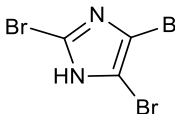
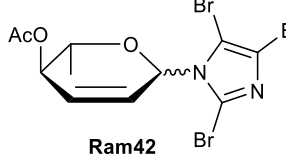
Schemat 36. Reakcja otrzymywania **Ram39**.

W reakcji tej, mimo możliwości występowania tautomerii oraz otrzymania innych produktów przegrupowania Ferriera, w zastosowanych warunkach produkt reakcji otrzymano w krótkim czasie 2 godz. oraz z bardzo dobrą wydajnością wynoszącą 82%, w proporcji anomerów $\alpha:\beta = 1:1$. Strukturę **Ram39** potwierdzono analizą widm ^1H i ^{13}C NMR i spektrometrii mas (ESI MS).

Kierując się pozytywnym wynikiem reakcji z 3-chloro-1,2,4-triazolem, postanowiono sprawdzić czy w tych samych warunkach reakcji uda się otrzymać *N*-glikozydy pochodne innych azoli. Do reakcji wybrano różnie podstawione imidazole, zawierające niepodstawiony atom azotu N-1 (**tabela 7**).

Tabela 7. Wydajności otrzymywania **Ram39-Ram42**.

Nukleofil	Produkt	Wydajność
<p>Sub39</p>	<p>Ram39</p>	82%
<p>Sub39</p>	<p>Fuk22</p>	51%
<p>Sub40</p>	<p>Ram40</p>	87%

		42%
		35%

W przypadku reakcji z **Sub41** wydajność otrzymanego produktu była na podobnym poziomie 87%, natomiast w przypadku reakcji z **Sub42** oraz **Sub43** była już na bardzo przeciętnym poziomie wynoszącym odpowiednio 42% i 35%. Struktury otrzymanych produktów **Ram39-Ram42** i **Fuk22** potwierdzono analizą widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Charakterystyczna dla **Ram41** była obecność na widmie protonowym multipletu przy 5.06-5.17 ppm o charakterystycznym kształcie, potwierdzającego obecność wiązania 2,3-nienasyconego pierścienia L-ramnozy oraz sygnałów przy 7.76 ppm i 7.08 ppm potwierdzających obecność fragmentu aromatycznego. Struktury potwierdziła także spektrometria mas (ESI MS). Struktury pozostałych pochodnych potwierdzono przez obecność podobnych sygnałów.

PODSUMOWANIE

Celem niniejszej pracy było opracowanie syntezy nowych glikokoniugatów mogących pełnić funkcję inhibitorów fukozylotransferazy 8 (FUT8). Ze względu na zwiększoną ekspresję FUT8 w komórkach nowotworowych (wątroby, piersi, jajnika, prostaty, płuc, trzustki, żołądka i innych), regulacja aktywności tego enzymu może być przydatna w kombinowanej terapii przeciwnowotworowej.

1. Pierwszym etapem pracy było otrzymanie pochodnych monosacharydów, donorów reszty cukrowej w późniejszych syntezach finalnych glikokoniugatów. W tej części badań z wolnych monosacharydów otrzymano *per-O*-acetylowane glikale L-fukozy, L-ramnozy, D-glukozy i D-galaktozy oraz 3,4-di-*O*-benzylo-L-ramnalu. Otrzymane glikale zostały zastosowane jako akceptory w reakcjach addycji do wiązania nienasyconego; w ten sposób otrzymano 2-deoksy-2-fluoro-pochodne L-fukozy oraz D-glukozy. Reakcje te prowadzono z udziałem Selectfluoru[®] jako czynnika fluorującego w mieszaninie DMF:H₂O w stosunku 1:1. Zastosowanie Selectfluoru[®] w tych warunkach umożliwiło regioselektywne wprowadzenie atomu fluoru na atom węgla C-2 pierścienia cukrowego.

W warunkach reakcji przegrupowania Ferriera otrzymano 2,3-nienasycone pochodne L-ramnozy. Z kolei w reakcji substytucji grupy acetylowej na węglu anomerycznym *per-O*-acetylowanych cukrów otrzymano 1-podstawione pochodne *per-O*-acetylowanej-L-ramnozy, *per-O*-acetylowanej-L-fukozy, 2-deoksy-2-fluoro-3,4-di-*O*-acetylo-L-fukozy i *per-O*-acetylowanej-D-glukozy. W przypadku reakcji otrzymywania 1-azydopochodnych cukrów donorem grupy azydkowej był TMSN₃, a katalizatorem SnCl₄. Zastosowanie takich warunków reakcji pozwoliło na otrzymanie 1-azydopochodnych cukrów z dobrymi wydajnościami z wysoką β-stereoselektywnością.

Na koniec tej części badań, do późniejszego zastosowania w reakcjach *click chemistry*, wychodząc z 1,3,4-tri-*O*-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozy, otrzymano propargilowe pochodne 2-deoksy-2-fluoro-L-fukozy, w reakcji substytucji grupy acetylowej na węglu anomerycznym pierścienia cukrowego, jako katalizator stosując eterat trifluorku boru (BF₃OEt₂).

2. Drugim etapem pracy było otrzymanie pochodnych nie cukrowych, zaprojektowanych w taki sposób, aby łatwe było ich zastosowanie w reakcjach z substratami cukrowymi i otrzymanie zaplanowanych produktów końcowych.

W reakcjach z bromoalkoholami otrzymano alkoksyłowe pochodne purpuryny oraz *N*-hydroksyalkilowe pochodne antrachinonu. Otrzymano szereg aminopochodnych 1,3,5-triazyny w reakcji z 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyną. Na koniec w warunkach reakcji Grignarda z 1,3,5-triazyną otrzymano 2,4-dichloro-6-propylo-1,3,5-triazynę.

W kolejnym etapie otrzymano odpowiednio zaplanowane propargilowe pochodne 1,3,4-oksadiazolu, furan-2(5*H*)-onu i 2*H*-pirol-2-onu oraz azydki 1,2,4-triazolu stanowiące substraty w reakcji z pochodnymi cukrów w warunkach reakcji *click chemistry*.

3. Ostatnim etapem pracy była synteza glikokoniugatów cukrowych, w których łączono otrzymane wcześniej pochodne cukrowe i niecukrowe. Odpowiednie pochodne otrzymano w warunkach reakcji przegrupowania Ferriera, w warunkach reakcji Mitsunobu, w wyniku addycji do wiązania nienasyconego glikalu oraz w warunkach reakcji *click chemistry*.

Zastosowanie warunków reakcji przegrupowania Ferriera pozwoliło na otrzymanie w łagodnych warunkach nowych, nie opisanych dotąd w literaturze, 2,3-nienasyconych *O*- i *N*-glikozydów z aglikonami będącymi pochodnymi antrachinonu, 1,3,5-triazyny i 1,2,4-triazolu.

Zastosowanie estryfikacji w warunkach reakcji Mitsunobu okazało się łatwą i wydajną metodą transformacji pochodnych L-ramnozy w pochodne L-fukozy.

W reakcji peracylowanych glikali i 2-amino-5-fenyl-1,3,4-tiadiazolu, w warunkach reakcji przegrupowania Ferriera stosując 2.0 ekw. jodu w THF, zamiast spodziewanych produktów przegrupowania, otrzymano produkty addycji atomu jodu do wiązania nienasyconego, otrzymując szereg nowych, nie opisanych dotąd w literaturze pochodnych.

W warunkach reakcji *click chemistry*, z azydowych i propargilowych pochodnych cukrów otrzymano szereg nowych glikokoniugatów, pochodnych L-fukozy, L-ramnozy oraz D-glukozy, zawierających w swojej strukturze jednostkę 1,2,3-triazolu.

Glikokoniugaty otrzymane w trakcie syntetycznej części pracy badawczej poddano następnie wstępnej ocenie ich aktywności biologicznej na liniach komórkowych oraz w badaniach z udziałem białka NodZ.

3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Metody ogólne

Przebieg reakcji chemicznych kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), wykorzystując do tego płytki aluminiowe pokryte warstwą żelu krzemionkowego (silica gel G₂₅₄ Merck). Do rozwijania płytek wykorzystywano następujące układy rozwijające: toluen:AcOEt, CHCl₃:MeOH, *n*-heksan:AcOEt. Do detekcji grup chromoforowych wykorzystywano lampę UV ($\lambda=254$ lub 366 nm), związków siarki – 5% wodny roztwór chlorku palladu, a do detekcji halogenów – 0.1% wodny roztwór błękitu bomofenolowego. Płytki TLC wywoływano po uprzednim spryskaniu ich 10% roztworem kwasu siarkowego(VI) w etanolu.

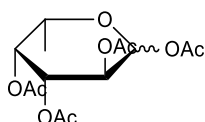
Chromatografie kolumnowe wykonywano w szklanych kolumnach o długościach oraz średnicach dostosowanych do ilości rozdzielanego materiału, wypełnionych żelem krzemionkowym (silica gel 60, 70-230 mesh, Merck). Jako eluent stosowano układy rozpuszczalników w odpowiednich stosunkach objętościowych: *n*-heksan:AcOEt, toluen:AcOEt, CH₂Cl₂:aceton, CH₃Cl:MeOH. Odpowiednie frakcje następnie zatężano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze nie większej niż 40 °C.

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR rejestrowane były za pomocą spektrometru typu Agilent 400 MHz oraz Varian 600 MHz, stosując jako rozpuszczalniki: CDCl₃, CD₃OD, DMSO-*d*₆, (CD₃)₂CO. Jako wzorzec wewnętrzny użyto TMS.

Temperatury topnienia oznaczano przy pomocy aparatu MTT-2 wykorzystując do tego zatopione kapilary.

1,2,3,4-tetra-O-acetylo-L-fukopiranoza (Fuk1)

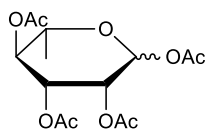
Procedura 1 [66-68]: Do roztworu L-fukozy (2 g, 12.183 mmol) w bezwodnej pirydynie (10 mL) wkropiono bezwodnik octowy (6 mL, 63.591 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC (toluen:AcOEt 2:1, v:v). Po 16 godz. mieszaninę reakcyjną wylano do wody z lodem (50 mL) i ekstrahowano CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Połączone fazy organiczne przemyto wodą (2 x 50 mL), suszono nad bezwodnym MgSO₄ i po odsączeniu środka suszącego zatężono na wyparce rotacyjnej. Otrzymano 3.887 g 1,2,3,4-tetra-O-acetylo-L-fukopiranozy **Fuk1** z wydajnością 96%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 2:1$, którą wykorzystano w następnym etapie bez dodatkowego oczyszczania.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.01 (d, 1H, $J=1.8$ Hz, H-1 α), 5.56 (d, 1H, $J=0.6$ Hz, H-1 β), 5.48-5.47 (m, 1H, H-3 β), 5.30 (dd, 1H, $J=3.0$ Hz, 10.2 Hz, H-3 α), 5.25-5.24 (m, 2H, H-2 α , H-2 β), 5.12 (dd, 1H, $J=9.6$ Hz, 10.2 Hz, H-4 α), 5.09-5.06 (m, 1H, H-4 β), 3.95 (dq, 1H, $J=6.6$ Hz, 10.2 Hz, 12.6 Hz, H-5 α), 3.71-3.66 (m, 1H, H-5 β), 2.21 (s, 3H, OAc α), 2.17 (s, 3H, OAc α), 2.16 (s, 3H, OAc β), 2.12 (s, 3H, OAc α), 2.10 (s, 3H, OAc β), 2.07 (s, 3H, OAc β), 2.00 (s, 3H, OAc α), 1.99 (s, 3H, OAc β), 1.29 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, H-6), 1.24 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, H-6 α); **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ 170.21 (COCH₃), 169.92 (COCH₃), 169.78 (COCH₃), 168.46 (COCH₃), 168.22 (COCH₃), 92.15 (C-1), 90.05 (C-1), 71.71 (C-4), 70.70 (C-4), 67.97 (C-3), 67.72 (C-3), 67.36 (C-2), 66.96 (C-2), 66.62 (C-5), 61.12 (C-5), 20.80 (COCH₃), 20.74 (COCH₃), 20.62 (COCH₃), 20.59 (COCH₃), 17.41 (C-6), 16.37 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₄H₂₀O₉: m/z 355.1 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 355.4.

1,2,3,4-tetra-O-acetylo-L-ramnopiranoza (Ram1)

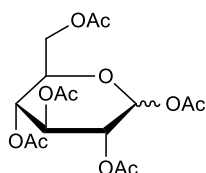
Otrzymano zgodnie z Procedurą 1. Do reakcji użyto L-ramnozę (2 g, 12.183 mmol). Otrzymano 3.968 g **Ram1** z wydajnością 98%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 2:1$.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.01 (d, 1H, *J*=1.8 Hz, H-1α), 5.85 (d, 1H, *J*=0.6 Hz, H-1β), 5.48-5.47 (m, 1H, H-3β), 5.30 (dd, 1H, *J*=3.0 Hz, 10.2 Hz, H-3α), 5.25-5.24 (m, 1H, H-2α), 5.13-5.06 (m, H, H-2β, H-4α, H-4β), 3.95 (dq, 1H, *J*=6.6 Hz, 10.2 Hz, H-5α), 3.71-3.66 (m, 1H, H-5β), 2.21 (s, 3H, OAcβ), 2.17 (s, 3H, OAcα), 2.16 (s, 3H, OAcα), 2.10 (s, 3H, OAcβ), 2.08 (s, 3H, OAcβ), 2.07 (s, 3H, OAcα), 2.00 (s, 3H, OAcα), 1.99 (2s, 3H, OAcβ), 1.29 (d, 3H, *J*=6.0 Hz, H-6β), 1.23 (d, 3H, *J*=6.0 Hz, H-6α); **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ 170.21 (C=O), 169.98 (C=O), 169.71 (C=O), 168.46 (C=O), 168.23 (C=O), 91.25 (C-1), 90.52 (C-1), 71.54 (C-4), 70.48 (C-4), 69.12 (C-3), 68.74 (C-3), 68.61 (C-2), 68.52 (C-2), 68.30 (C-5), 67.56 (C-5), 20.81 (COCH₃), 20.72 (COCH₃), 20.60 (COCH₃), 20.54 (COCH₃), 17.31 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₄H₂₀O₉: *m/z* 355.1 [M+Na]⁺; wyznaczone *m/z* 355.3.

1,2,3,4,6-penta-O-acetylo-D-glukopiranoza (Glu1)

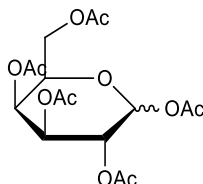
Otrzymano zgodnie z Procedurą 1. Do reakcji użyto D-glukozę (2 g, 11.101 mmol). Otrzymano 4.290 g **Glu1** z wydajnością 99%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów α:β = 2:1.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.31 (d, 1H, *J*=3.6 Hz, H-1α), 5.72 (d, 1H, *J*=7.8 Hz, H-1β), 5.37 (dd, 1H, *J*=10.2 Hz, 10.8 Hz, H-3α), 5.27-5.18 (m, 1H, H-3β), 5.13-5.06 (m, 4 H, H-2α, H-2β, H-4β, H-4α), 4.29-4.22 (m, 2H, H-6αα, H-6αβ), 4.15-4.07 (m, 3H, H-6bα, H-6bβ, H-5α), 3.87-3.76 (m, 1H, H-5β), 2.18 (s, OAc), 2.11 (s, OAc), 2.08 (s, OAc), 2.02 (s, OAc); **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ 170.22 (C=O), 170.01 (C=O), 169.83 (C=O), 169.77 (C=O), 168.96 (C=O), 92.22 (C-1β), 89.95 (C-1α), 72.76 (C-3β), 72.63 (C-5β), 70.82 (C-3α), 70.51 (C-5α), 70.21 (C-2β), 69.83 (C-2α), 67.81 (C-4α), 67.75 (C-4β), 61.36 (C-6β), 61.20 (C-6α), 21.21 (COCH₃), 20.98 (COCH₃), 20.66 (COCH₃), 20.34 (COCH₃); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₆H₂₂O₁₁: *m/z* 413.1 [M+Na]⁺; wyznaczone *m/z* 413.2.

1,2,3,4,6-penta-O-acetylo-D-galaktopiranoza (Gal1)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 1. Do reakcji użyto D-galaktozę (2 g, 11.101 mmol). Otrzymano 4.247 g **Gal1** z wydajnością 98%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 2:1$.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 6.36 (bs, 1H, H-1 α), 5.62 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H-1 β), 5.48 (bs, 1H, H-4 α), 5.38 (bs, 1H, H-4 β), 5.34-5.27 (m, 3H, H-2 α , H-2 β , H-3 α), 5.15-5.08 (dd, 1H, $J=10.2$ Hz, 3.0 Hz, 1H, H-3 β), 4.35-4.31 (m, 2H, H-6 $\alpha\beta$, H-5 α), 4.10-4.06 (m, 3H, H-6 $\alpha\beta$, H-6 β , H-5 β), 2.16 (s, 3H, OAc α), 2.15 (s, 3H, OAc α), 2.13 (s, 3H, OAc β), 2.12 (s, 3H, OAc α), 2.08 (s, 3H, OAc α), 2.05 (s, 3H, OAc α), 2.03 (s, 3H, OAc β), 2.01 (s, 3H, OAc β), 2.00 (s, 3H, OAc β), 1.98 (s, 3H, OAc β); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ 171.05 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3\beta$), 170.82 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3\alpha$), 170.09 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3\alpha$), 169.88 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3\beta$), 169.17 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3\alpha$), 168.73 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3\beta$), 92.48 (C-1 β), 90.01 (C-1 α), 71.96 (C-5 β), 71.02 (C-3 β), 69.02 (C-5 α), 68.28 (C-2 β), 67.95 (C-3 α), 67.60 (C-2 α), 67.14 (C-4 β), 66.74 (C-4 α), 61.82 (C-6 β), 61.38 (C-6 α), 21.13 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.06 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.88 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.72 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: m/z 413.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; wyznaczone m/z 412.8.

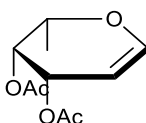
2,6-anhydro-3,4-di-O-acetylo-1,5-dideoksy-L-arabino-heks-5-enitol (3,4-di-O-acetylo-L-fukal) (Fuk3)

Procedura 2 [66-68]: Do roztworu 1,2,3,4-tetra-O-acetylo-L-fukopiranozy (**Fuk1**: 1 g, 3.009 mmol) rozpuszczonej w CH_2Cl_2 (10 mL), schłodzonego w łaźni wodno-lodowej o temperaturze 0 °C wkroplono 33% HBr w CH_3COOH (12 mL, 6.627 mmol). Reakcje prowadzono w temperaturze 0 °C przez 4 godz. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC (toluen:AcOEt 2:1, v:v). Następnie mieszaninę reakcyjną wylano do wody z lodem (30 mL) i ekstrahowano CH_2Cl_2 (3 x 15 mL). Połączone fazy organiczne przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 (2 x 30 mL) oraz wodą (2 x 30 mL), suszono nad bezwodnym MgSO_4 i po odsączeniu środka suszącego zatężono na wyparce rotacyjnej.

Otrzymano 882.1 mg bromku 2,3,4-tri-*O*-acetylo-L-fukopiranozy w postaci brązowego oleju, z wydajnością 83%, którą wykorzystano w następnym etapie bez dodatkowego oczyszczania.

Metoda 1^[69]: Do kolby z Cp_2TiCl_2 (355.0 mg, 1.426 mmol) i Mn (160.6 mg, 2.926 mmol), w atmosferze Ar wkroplono roztwór bromku 2,3,4-tri-*O*-acetylo-L-fukopiranozy (251.7 mg, 0.713 mmol) w THF (5 mL). Reakcję prowadzono przez 12 godz. W temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym, kontrolując jej przebieg metodą TLC (toluen:AcOEt 2:1, v/v). Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu mieszaninę poreakcyjną przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem na lejku Büchnera, przepłukując osad octanem etylu (3 x 10 mL). Otrzymaną frakcję organiczną przemyto zimnym roztworem NaHCO_3 (2 x 10 mL) i wodą (2 x 10 mL). Oddzieloną fazę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO_4 , przesączono i zateżono na wyparce rotacyjnej, a następnie oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie *n*-heksan:AcOEt (10:1, v/v). Otrzymano 68.7 mg 3,4-di-*O*-acetylo-L-fukalu (**Fuk3**) w postaci żółtego, krzepnącego oleju z wydajnością 45%.

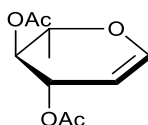
Metoda 2^[68]: Bromek 2,3,4-tri-*O*-acetylo-L-fukopiranozy (882.1 mg, 2.498 mmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonie (20 mL), całość ochłodzono do temperatury 0 °C, wprowadzono nasycony roztwór NaH_2PO_4 (40 mL) oraz pył cynkowy (8.2 g, 12.542 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano na mieszadle magnetycznym, w łaźni lodowej przez 4 godz. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC (toluen:AcOEt 2:1, v/v). Po całkowitym przereagowaniu substratu, mieszaninę reakcyjną rozcieńczono octanem etylu (30 mL), przesączono na lejku Büchnera, a przesącz przemyto solanką (3 x 15 mL), NaHCO_3 (3 x 15 mL) i wodą (3 x 15 mL). Fazę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO_4 , przesączono, zateżono na wyparce rotacyjnej i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie *n*-heksan:AcOEt (10:1, v/v). Otrzymano 321.0 mg 3,4-di-*O*-acetylo-L-fukalu (**Fuk3**) z wydajnością 60%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 6.46 (dd, 1H, $J=1.8$ Hz, 6.0 Hz, H-1), 5.58 (m, 1H, H-4), 5.29 (dt, 1H, $J=1.8$ Hz, 4.8 Hz, H-3), 4.64 (dt, 1H, $J=2.4$ Hz, 6.6 Hz, H-2), 4.22 (dd, 1H, $J=6.6$ Hz, 13.2 Hz, H-5), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 1.28 (d, 3H, $J=6.6$ Hz, H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ 170.82 ($\text{C}=\text{O}$), 170.55 ($\text{C}=\text{O}$), 146.26 (C-1), 98.41 (C-2), 71.70 (C-5), 66.44 (C-3), 65.25 (C-4), 21.06 (COCH_3), 20.82 (COCH_3), 16.64 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5$: m/z 215.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 214.7.

1,5-anhydro-3,4-di-O-acetylo-2,6-dideoksy-L-arabino-heks-1-enitol (3,4-di-O-acetylo-L-ramnal) (Ram3)

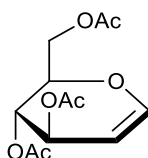
Otrzymano zgodnie z Procedurą 2. Do reakcji użyto 1,2,3,4-tetra-O-acetylo-L-ramnopiranozę (**Ram1**: 1 g, 3.009 mmol). Otrzymano 427.4 mg **Ram3** z wydajnością 78%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 6.43 (dd, 1H, $J=6.0$ Hz, 1.8 Hz, H-1), 5.35-5.43 (m, 1H, H-3), 5.03 (dd, 1H, $J=8.4$ Hz, 6.0 Hz, H-4), 4.78 (dd, 1H, $J=6.0$ Hz, 3.0 Hz, H-2), 4.11 (dq, 1H, $J=8.4$ Hz, 6.6 Hz, H-5), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 1.31 (d, 3H, $J=6.6$ Hz, H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ 170.81 ($\text{C}=\text{O}$), 170.06 ($\text{C}=\text{O}$), 146.14 (C-1), 98.99 (C-2), 72.73 (C-5), 72.06 (C-4), 68.47 (C-3), 21.23 (COCH_3), 21.07 (COCH_3), 16.76 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5$: m/z 215.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 215.5.

1,5-anhydro-3,4,6-tri-O-acetylo-2-deoksy-D-arabino-heks-1-enitol (3,4,6-tri-O-acetylo-D-glukal) (Glu3)

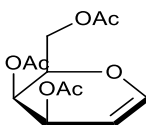
Otrzymano zgodnie z Procedurą 2. Do reakcji użyto 1,2,3,4,6-penta-O-acetylo-D-glukopiranozę (**Glu1**: 1 g, 2.562 mmol). Otrzymano 765.3 mg **Glu3** z wydajnością 89%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 6.48 (d, 1H, $J=6.0$ Hz), 5.32 (dd, 1H, $J=4.2$ Hz, 3.6 Hz, H-3), 5.18 (dd, 1H, $J=7.8$ Hz, 6.0 Hz, H-2), 4.88 (dd, 1H, $J=9.6$ Hz, 3.6 Hz, H-4), 4.36 (dd, 1H, $J=12.0$ Hz, 6.0 Hz, H-6a), 4.23 (m, 1H, H-5), 4.14 (dd, 1H, $J=12.0$ Hz, 3.0 Hz, H-6b), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ 170.57 ($\text{C}=\text{O}$), 170.24 ($\text{C}=\text{O}$), 169.59 ($\text{C}=\text{O}$), 145.98 (C-1), 99.23 (C-2), 74.34 (C-5), 73.82 (C-4), 67.55 (C-3), 61.52 (C-6), 21.28 (COCH_3), 21.00 (COCH_3), 20.69 (COCH_3); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$: m/z 295.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; wyznaczone m/z 294.7.

2,6-anhydro-3,4,6-tri-O-acetylo-5-deoksy-D-arabino-heks-5-enitol (3,4,6-tri-O-acetylo-D-galakta) (Gal3)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 2. Do reakcji użyto 1,2,3,4,6-penta-O-acetylo-D-galaktopiranozę (**Gal1**: 1 g, 2.562 mmol). Otrzymano 739.5 mg **Gal3** z wydajnością 87%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju.

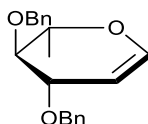


$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 6.42 (d, 1H, $J=5.4$ Hz, H-1), 5.51 (m, 1H, H-3), 5.46 (dd, 1H, $J=3.6$ Hz, 1.2 Hz, H-2), 4.68 (m, 1H, H-4), 4.32 (m, 1H, H-5), 4.25 (dd, 1H, $J=11.6$ Hz, 7.2 Hz, H-6a), 4.18 (dd, 1H, $J=11.4$ Hz, 5.4 Hz, H-6b), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ 170.62 ($\text{C}=\text{O}$), 170.54 ($\text{C}=\text{O}$), 170.17 ($\text{C}=\text{O}$), 145.64 (C1), 98.70 (C-2), 72.72 (C-5), 63.64 (C-4), 63.43 (C-3), 61.21 (C-6), 20.80 (COCH_3), 20.73 (COCH_3), 20.24 (COCH_3); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$: m/z 273.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 272.8.

1,5-anhydro-3,4-di-O-benzylo-2,6-dideoksy-L-arabino-heks-1-enitol (3,4-di-O-benzylo-L-ramnal) (Ram4) [70]

Do roztworu 3,4-di-O-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**: 500 mg, 2.334 mmol) rozpuszczonego w bezwodnym MeOH (25 mL) dodano metanolan sodu (13.9 mg, 0.257 mmol, 0.11eq), ochłodzono w łaźni wodno-lodowej do temperatury 0 °C. Całość mieszano na mieszadle magnetycznym, w łaźni lodowej przez 2.5 godz. Postęp reakcji kontrolowano metodą

TLC (toluen:AcOEt 2:1, v:v). Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu MeOH oparowano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w bezwodnym DMF (25 mL), schłodzono na łaźni wodno-lodowej do temperatury 0 °C, porcjami dodano NaH (252.1 mg, 10.503 mmol) i mieszano przez 2 godz. Następnie dodano BnBr (1.249 mL, 10.503 mmol) i kontynuowano mieszanie. Po 2 godz. zdjęto łaźnię wodno-lodową i dalej mieszano. Po 12 godz., nastąpiło całkowite przereagowanie substratu, mieszaninę reakcyjną rozcieńczono octanem etylu (15 mL) i przemywano wodnym roztworem NH₄Cl (3 x 15 mL) i solanką (3 x 15 mL). Fazę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO₄, przesączono, zatężono na wyparce rotacyjnej i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie *n*-heksan:AcOEt (30:1, v/v). Otrzymano 333.3 mg 3,4-di-*O*-benzylo-L-ramnalu (**Ram4**) z wydajnością 46%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju.

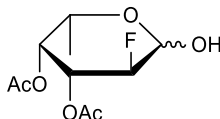


¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.27-7.36 (m, 10H, -Ph), 4.86 (dd, 1H, *J*=1.2 Hz, 6.0 Hz, H-1); 4.88 (d, 1H, *J*=11.4Hz, -CH_a-Ph), 4.86 (dd, 1H, *J*=2.4 Hz, 6.0 Hz, H-2), 4.68 (d, 1H, *J*=11.4 Hz, -CH_b-Ph), 4.66 (d, 1H, *J*=12.0 Hz, -CH_a-Ph), 4.57 (d, 1H, *J*=12.0 Hz, -CH_b-Ph), 4.21 (ddd, 1H, *J*=1.8 Hz, 2.4 Hz, 6.6 Hz, H-3), 3.95 (dq, 1H, *J*=6.6 Hz, 9.0 Hz, H-5), 3.49 (dd, 1H, *J*=6.6 Hz, 9.0 Hz, H-4), 1.38 (d, 3H, *J*=6.6 Hz, H-6); **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ 144.94 (C-1), 138.58, 138.44, 128.55, 128.89, 128.10, 127.77, 100.29 (C-2), 79.70 (C-4), 76.60 (C-3), 74.20 (-CH₂-Ph), 74.12 (C-5), 70.69 (-CH₂-Ph), 17.64 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₂₀H₂₂O₃: *m/z* 311.2 [M+H]⁺; wyznaczone *m/z* 311.5.

3,4-di-*O*-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranoza (Fuk4)

Procedura 3a [¹¹⁴]: Do roztworu 3,4-di-*O*-acetylo-L-fukalu (**Fuk3**: 500 mg, 2.334 mmol) w mieszaninie DMF:H₂O (10 mL, 1:1 (v/v)) dodano Selectfluor® (992 mg, 2.801 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez noc. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC (toluen:AcOEt 4:1, v:v). Po 12 godz. mieszaninę reakcyjną rozcieńczono octanem etylu (20 mL), a oddzieloną fazę organiczną przemywano wodą (3 x 10 mL). Połączone frakcje organiczne suszono nad bezwodnym

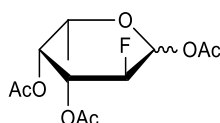
MgSO₄ i po odsączeniu środka suszącego zateżono na wyparce rotacyjnej otrzymując 443.9 mg **Fuk4** z wydajnością 76%, w postaci bezbarwnego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1.5:1$.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.42 (dd, $J=3.6$ Hz, 10.4 Hz, H-1 β), 5.25 (d, $J=4.4$ Hz, H-1 α), 5.12-5.33 (m, 4H, H-3 α , H-3 β , H-4 α , H-4 β), 4.26-4.62 (m, 2H, H-2 α , H-2 β), 4.26 (q, 1H, $J=6.8$ Hz, 9.6 Hz, H-5 β), 3.88 (m, 1H, H-5 α), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.91 (s, 3H, OAc), 1.22 (d, 1H, $J=6.4$ Hz, H-6 α), 1.18 (d, 1H, $J=6.4$ Hz, H-6 β);
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.34 (COCH₃), 170.10 (COCH₃), 93.76 (d, $J=22.9$ Hz, C-1), 88.65 (d, $J=182.0$ Hz, C-1), 71.63 (C-4), 71.32 (C-4), 70.36 (C-3), 70.76 (C-3), 69.57 (C-5), 69.41 (C-5), 21.32 (COCH₃), 21.12 (COCH₃), 20.61 (COCH₃), 17.12 (C-6), 16.70 (C-6);
MS(ESI): obliczone dla C₁₀H₁₅FO₆: m/z 273.1 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 273.4.

1,3,4-tri-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranoza (Fuk5)

Procedura 3b [¹¹⁴]: Do **Fuk4** (443.9 mg, 1.774 mmol) rozpuszczonego w bezwodnej pirydynie (10 mL) oraz bezwodniku octowym (10 mL) dodano DMAP (14 mg, 0.117 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano na mieszadle magnetycznym przez 2 godz. W temperaturze pokojowej. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC (toluen:AcOEt 4:1, v/v). Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu pirydynę odparowano na wyparce rotacyjnej, a pozostałość rozdzielono na kolumnie chromatograficznej w układzie *n*-heksan:AcOEt (6:1, v/v). Otrzymano 492.6 mg **Fuk5** z wydajnością 95%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1.5:1$.

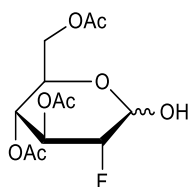


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.43 (d, $J=4.2$ Hz, H-1 α), 5.78 (dd, $J=4.2$ Hz, 7.8 Hz, H-1 β), 5.43 (m, 3H, H-3 α , H-3 β , H-4 α), 5.36 (tt, 1H, $J=3.6$ Hz, 10.4 Hz, H-4 β), 4.78-4.89 (m, 1H,

H-2 α), 4.57-4.71 (m, 1H, H-2 β), 4.28 (q, 1H, $J=1.2$ Hz, 6.6 Hz, H-5 α), 3.98 (q, 1H, $J=1.2$ Hz, 6.6 Hz, H-5 β), 2.19 (s, 3H, OAc), 2.18 (s, 3H, OAc), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.24 (d, $J=6.6$ Hz, H-6 β), 1.16 (d, 1H, $J=6.6$ Hz, H-6 α); **^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3)**: δ 171.18 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 170.54 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 170.01 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 169.95 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 169.26 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 91.54 (d, $J=97.2$ Hz, C-1), 89.14 (d, $J=88.6$ Hz, C-2), 73.70 (C-4), 71.91 (C-4), 69.44 (C-3), 69.14 (C-3), 67.47 (C-5), 67.06 (C-5), 21.02 (COCH_3), 20.88 (COCH_3), 20.70 (COCH_3), 20.49 (COCH_3), 20.44 (COCH_3), 16.79 (C-6), 15.67 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{FO}_7$: m/z 315.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; wyznaczone m/z 315.3.

3,4,6-tri-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-D-glukopiranoza (Glu4)

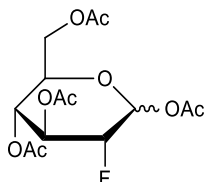
Otrzymano zgodnie z Procedurą 3a. Do reakcji użyto 3,4,6-tri-O-acetylo-D-glukal (**Glu3**: 500 mg, 3.673 mmol). Otrzymano 464.2 mg **Glu4** z wydajnością 82%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju, $\alpha:\beta = 1.5:1$.



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.86 (dt, 1H, $J=9.6$ Hz, 12.0 Hz, H-C3 α), 5.52 (t, 1H, $J=3.6$ Hz, H-C1 α), 5.48 (dt, 1H, $J=9.2$ Hz, 14.0 Hz, H-C3 β), 5.11 (t, 1H, $J=9.6$ Hz, H-C4 β), 5.05 (t, 1H, $J=9.6$ Hz, H-C4 α), 4.87 (m, 1H, H-C1 β), 4.48-4.52 (m, 1H, H-C2 α), 4.19-4.22 (m, 1H, H-C2 β), 4.17-4.19 (m, 3H, H-C5 α , H-C6 α , H-C6 β), 4.06-4.15 (m, 2H, H-C6 α , H-C6 β), 3.72 (dq, 1H, $J=2.4$ Hz, 4.8 Hz, 10.0 Hz, H-C5 β), 2.07 (s, 6H, 2 \times OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 6H, 2 \times OAc), 2.03 (s, 3H, OAc); **^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3)**: δ 170.73 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 170.68 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 170.34 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 170.09 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 169.83 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 169.58 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 93.85 (d, $J=23.3$ Hz, C-1), 89.84 (d, $J=190.1$ Hz, C-1), 89.61 (d, $J=21.2$ Hz, C-2), 87.51 (d, $J=192.4$ Hz, C-2), 72.51 (d, $J=19.9$ Hz, C-3), 72.03 (C-5), 70.56 (d, $J=19.1$ Hz, C-4), 68.58 (d, $J=7.4$ Hz, C-4), 68.02 (d, $J=7.3$ Hz, C-3), 67.13 (C-5), 61.84 (C-6), 61.63 (C-6), 21.58 (COCH_3), 21.43 (COCH_3), 20.98 (COCH_3), 20.74 (COCH_3), 20.65 (COCH_3), 20.41 (COCH_3); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{FO}_8$: m/z 331.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; wyznaczone m/z 331.4.

1,3,4,6-tetra-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-D-glukopiranoza (Glu5)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 3b. Otrzymano 511.7 mg **Glu5** z wydajnością 97%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju, $\alpha:\beta = 1.5:1$.

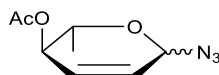


¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.42 (dd, $J=3.6$ Hz, 1H, H-1 α), 5.78 (dd, $J=3.6$ Hz, 8.4 Hz, 1H, H-1 β), 5.55 (dt, $J=9.6$ Hz, 12.6 Hz, 1H, H-3 α), 5.37 (dt, $J=9.0$ Hz, 14.4 Hz, 1H, H-3 β), 5.05-5.11 (m, 2H, H-4 α , H-4 β), 4.66 (ddd, $J=4.2$ Hz, 9.6 Hz, 48.6 Hz, 1H, H-2 α), 4.45 (ddd, $J=8.4$ Hz, 9.0 Hz, 51.0 Hz, 1H, H-2 β), 4.27-4.31 (m, 2H, H-6 α , H-6 β), 4.06-4.10 (m, 3H, H-5 α , H-6 α , H-6 β), 3.86 (ddd, $J=2.4$ Hz, 4.8 Hz, 10.2 Hz, 1H, H-5 β), 2.21 (s, 3H, OAc α), 2.18 (s, 3H, OAc β), 2.09 (s, 6H, OAc), 2.08 (s, 6H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc α), 2.04 (s, 3H, OAc β). **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ 170.64 (COCH₃), 170.22 (COCH₃), 169.96 (COCH₃), 169.62 (COCH₃), 169.56 (COCH₃), 168.91 (COCH₃), 168.74 (COCH₃), 91.35 (d, $J=24.2$ Hz, C-1 β), 88.30 (d, $J=191.3$ Hz, C-1 α), 88.43 (d, $J=22.1$ Hz, C-2), 86.30 (d, $J=194.0$ Hz, C-2), 72.88 (C-5), 72.82 (d, $J=18.2$ Hz, C-3), 70.68 (d, $J=19.4$ Hz, C-3), 69.66 (C-5), 67.72 (d, $J=7.2$ Hz, C-4), 67.52 (d, $J=7.4$ Hz, C-4), 61.45 (C-6), 61.18 (C-6), 20.97 (COCH₃), 20.93 (COCH₃), 20.82 (COCH₃), 20.80 (COCH₃), 20.76 (COCH₃), 20.67 (COCH₃); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₄H₁₉FO₉: m/z 351.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 351.2.

azydek 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozylowy (Ram5)

Procedura 4 [⁸⁴]: Do roztworu 3,4-di-O-acetylo-L-ramnalalu (**Ram3**: 500 mg, 2.334 mmol) rozpuszczonego w CH₂Cl₂ (5 mL) dodano jod (47.5 mg, 0.187 mmol), ochłodzono do temperatury 0 °C w łaźni wodno-lodowej, wkroplono TMSN₃ (456 μ L, 3.505 mmol, 1.5 eq) i mieszano przez 10min. Następnie usunięto łaźnię wodno-lodową i mieszano przez 8 godz. w temperaturze pokojowej. Po zaobserwowaniu zaniku substratu cukrowego (analiza TLC: toluen:AcOEt 2:1, v/v) mieszaninę poreakcyjną rozcieńczono wodą (10 mL), a następnie fazę wodną ekstrahowano CH₂Cl₂ (2 x 10 mL). Połączone fazy

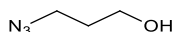
organiczne suszono nad bezwodnym MgSO_4 , przesączono, zateżono na wyparce rotacyjnej i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, stosując toluen jako eluent. Otrzymano 363.6 mg **Ram5** z wydajnością 78%, w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:1.5$.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.99 (ddd, 1H, $J=2.0$ Hz, 2.8 Hz, 6.0 Hz, H-3 β), 5.93 (dt, 1H, $J=1.6$ Hz, 10.4 Hz, H-3 α), 5.81 (dt, 1H, $J=1.6$ Hz, 10.4 Hz, H-2 β), 5.76 (ddd, 1H, $J=2.0$ Hz, 2.8 Hz, 10.0 Hz, H-2 α), 5.63 (bs, 1H, H-1 α), 5.46-5.48 (m, 1H, H-4 α), 5.37 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, H-1 β), 5.25-5.27 (m, 1H, H-4 β), 4.11-4.16 (m, 1H, H-5), 3.96-4.01 (m, 1H, H-5), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.13 (s, 3H, OAc), 1.31 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6 β), 1.29 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, H-6 α); **$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):** δ 170.26 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 170.08 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 130.33 (C-3), 129.45 (C-3), 128.18 (C-2), 126.46 (C-2), 88.85 (C-1), 84.61 (C-1), 73.03 (C-4), 72.57 (C-4), 69.45 (C-5), 67.10 (C-5), 20.07 (COCH_3), 20.81 (COCH_3), 17.18 (C-6), 16.9 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$: m/z 198.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 198.5.

3-azydopropan-1-ol (Sub1) ^[85]

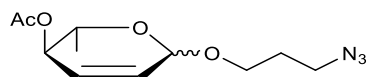
Do roztworu 3-bromopropan-1-olu (3.5 ml, 38.704 mmol) w wodzie (40 mL) dodano NaN_3 (5.032 g, 77.403 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 60 °C przez 24 godz. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej i ekstrahowano octanem etylu (2 x 30 mL). Połączone fazy organiczne suszono nad bezwodnym MgSO_4 , środek suszący odsączono, a przesącz zateżono na wyparce rotacyjnej, otrzymując 3.757 g **Sub1** z wydajnością 96%, w postaci bezbarwnego oleju, który stosowano w kolejnych reakcjach bez dodatkowego oczyszczania.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz; CDCl_3): δ 3.75 (t, $J=5.4$ Hz, 2H, H-1), 3.45 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, H-3), 1.83 (qi, $J=6.0$ Hz, 2H, H-2); **$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz; CDCl_3):** δ 59.94 (C-1), 48.57 (C-3), 31.54 (C-2); **MS(ESI):** obliczone dla $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$: m/z 124.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; wyznaczone m/z 124.2.

3-azydopropyl 4-O-acetylo-2,3,6-trideoxy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram6)

Procedura 5 [86]: Do roztworu 3,4-di-O-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**: 200 mg, 0.934 mmol) rozpuszczonego w bezwodnym CH₂Cl₂ (5 mL), schłodzonego do temperatury 0 °C dodano FeCl₃ (15.2 mg, 0.094 mmol) i 3-azydopropan-1-ol (**Sub1**: 104.0 mg, 1.029 mmol). Następnie reakcję kontynuowano w temperaturze pokojowej, na mieszadle magnetycznym przez 2 godz. Po stwierdzeniu zaniku substratu cukrowego (TLC toluen:AcOEt 2:1, v/v) mieszaninę reakcyjną wylano do nasyconego wodnego roztworu NaHCO₃ (10 mL), a następnie oddzieloną fazę wodną ekstrahowano octanem etylu (2 x 10mL). Połączone fazy organiczne przemyto solanką (10 mL), suszono nad bezwodnym MgSO₄, przesączono, zatężono na wyparce rotacyjnej i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie *n*-heksan:AcOEt (5:1, v/v), otrzymując 206.8 mg **Ram6** z wydajnością 87%, w postaci bezbarwnego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:6$.

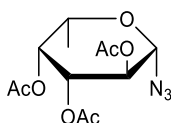


¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.85-5.87 (m, 1H, H-2/3), 5.78-5.81 (m, 1H, H-2/3), 5.05-5.07 (m, 1H, H-1), 4.96 (m, 1H, H-4), 3.94 (dq, $J=6.6$ Hz, 9.0 Hz, 1H, H-5), 3.87 (dt, $J=6.0$ Hz, 9.6 Hz, -CH-), 3.56 (dt, $J=6.6$ Hz, 10.2 Hz, -CH-), 3.40-3.43 (m, 2H, -CH₂-), 2.09 (s, 3H, OAc α), 2.08 (s, 3H, OAc β), 1.89 (qi, $J=6.6$ Hz, 2H, -CH₂-), 1.31 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-6 β), 1.23 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-6 α); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): 171.54 (C=OCH₃), 170.64 (C=OCH₃), 129.92 (C-3), 129.67 (C-3), 127.77 (C-2), 126.85 (C-2), 94.65 (C-1), 91.92 (C-1), 71.09 (C-4), 70.56 (C-4), 68.91 (C-5), 68.28 (C-5), 65.10 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 48.66 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 29.43 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 21.28 (COCH₃), 20.92 (COCH₃), 18.71 (C-6), 17.39 (C-6); MS(ESI): obliczone dla C₁₁H₁₇N₃O₄: m/z 278.1 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 278.5.

azydek 2,3,4-tri-O-acetylo- β -L-fukopiranozylowy (Fuk6)

Procedura 6 [87]: Do roztworu 1,2,3,4-tetra-O-acetylo-L-fukopiranozy (**Fuk1**: 500 mg, 1.505 mmol) w bezwodnym CH₂Cl₂ (5 mL) dodano TMSN₃ (799 μ L, 6.020 mmol) i SnCl₄ (1M roztwór w CH₂Cl₂, 391 μ L, 0.391 mmol) w atmosferze argonu i mieszano

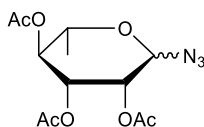
na mieszadło magnetyczne, w temperaturze pokojowej przez 24 godz. Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu cukrowego (analiza TLC: toluen:AcOEt 2:1, v/v) mieszaninę poreakcyjną przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (2 x 10 mL), a następnie fazę wodną ekstrahowano CH₂Cl₂ (2 x 10 mL). Połączone fazy organiczne przemyto H₂O (2 x 10 mL), suszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący odsączono i przesącz zatężono na wyparce rotacyjnej. Otrzymano 464.9 mg **Fuk6**, z wydajnością 98%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju, jako anomer β , $\alpha^{25}_D = 22.7$ (c = 1.0, CHCl₃).



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.27 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, H-3), 5.13 (dd, $J=9.0$ Hz, 9.6 Hz, 1H, H-4), 4.99 (dd, $J=3.0$ Hz, 10.2 Hz, 1H, H-2), 4.59 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-1), 3.92 (q, $J=6.0$ Hz, 12.0 Hz, 1H, H-5), 2.19 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.26 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, H-6); **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ 170.46 (COCH₃), 170.02 (COCH₃), 169.48 (COCH₃), 88.26 (C-1), 71.53 (C-4), 71.15 (C-2), 69.92 (C-3), 68.94 (C-5), 20.69 (COCH₃), 20.67 (COCH₃), 20.54 (COCH₃), 16.08 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₂H₁₇N₃O₇: m/z 338.1 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 338.3.

azydek 2,3,4-tri-O-acetylo-L-ramnopiranozylowy (Ram7)

Otrzymano zgodnie z Procedura 6. Do reakcji użyto 1,2,3,4-tetra-O-acetylo-L-ramnopiranozę (**Ram1**: 500 mg, 1.505 mmol). Otrzymano 460.2 mg **Ram7** z wydajnością 97%, w postaci białego ciała stałego, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:8$; **T.t.** 64.8 – 66.9 °C; Lit. **T.t.** = 64 °C [¹¹⁵].

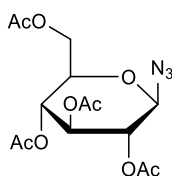


¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.44 (dd, 1H, $J=1.2$ Hz, 3.6 Hz, H-4 β), 5.32 (d, 1H, $J=1.8$ Hz, H-1 α), 5.20 (dd, 1H, $J=3.0$ Hz, 10.2 Hz, H-4 α), 5.15-5.14 (m, 1H, H-2 α), 5.09 (t, 2H, $J=10.2$ Hz, H-3 α , H-2 β), 4.99 (dd, 1H, $J=3.6$ Hz, 10.2 Hz, H-3 β), 4.69 (d, 1H, $J=1.2$ Hz,

H-1 β), 4.03 (dq, 1H, $J=6.0$ Hz, 9.6 Hz, H-5 α), 3.63 (dq, 1H, $J=6.0$ Hz, 9.6 Hz, H-5 β), 2.21 (s, 3H, OAc β), 2.17 (s, 3H, OAc α), 2.06 (s, 6H, OAc α , OAc β), 1.99 (s, 6H, OAc α , OAc β), 1.33 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, H-6 β), 1.28 (d, 3H, $J=6.6$ Hz, H-6 α); $^{13}\text{C NMR (150 MHz, CDCl}_3\text{)}$: δ 170.16 (C=OCH_3), 170.02 (C=OCH_3), 170.09 (C=OCH_3), 87.66 (C-1), 70.62 (C-4), 69.28 (C-2), 68.53 (C-3), 68.48 (C-5), 21.04 (COCH_3), 20.99 (COCH_3), 20.83 (COCH_3), 17.64 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$: m/z 316.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 315.9.

azydek 2,3,4,6-tetra-O-acetylo- β -D-glukopiranozylowy (Glu6)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 6. Do reakcji użyto 1,2,3,4-tetra-O-acetylo- β -D-glukopiranozę (**Glu1**: 500 mg, 1.281 mmol). Otrzymano 463.8 mg **Glu6** z wydajnością 97%, w postaci białego ciała stałego, jako anomer β ; **T.t.** = 125.2 – 126.9 °C; **Lit. T.t.** = 125.6 – 126.5 °C [¹¹⁶]; $\alpha^{25}_{\text{D}} = -23.9$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

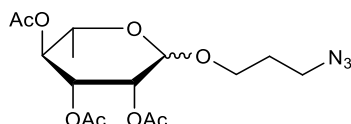


$^1\text{H NMR (600 MHz, CDCl}_3\text{)}$: δ 5.22 (t, 1H, $J=9.6$ Hz, H-2), 5.11 (t, 1H, $J=9.6$ Hz, H-3), 4.96 (t, 1H, $J=9.0$ Hz, H-4), 4.65 (d, 1H, $J=9.0$ Hz, H-1), 4.28 (dd, 1H, $J=4.8$ Hz, 12.0 Hz, H-6a), 4.18 (dd, 1H, $J=1.8$ Hz, 12 Hz, H-6b), 3.79-3.81 (m, 1H, H-5), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc); $^{13}\text{C NMR (150 MHz, CDCl}_3\text{)}$: δ 170.72 (C=OCH_3), 170.26 (C=OCH_3), 169.43 (C=OCH_3), 169.30 (C=OCH_3), 88.19 (C-1), 74.27 (C-2), 72.80 (C-3), 70.84 (C-4), 68.06 (C-5), 61.82 (C-6), 20.86 (COCH_3), 20.73 (COCH_3), 20.57 (COCH_3); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_9$: m/z 396.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; wyznaczone m/z 396.3.

3-azydopropyl 2,3,4-tri-O-acetylo- β -L-ramnopiranozyd (Ram8) [⁸⁸]

Do roztworu 1,2,3,4-tetra-O-acetylo-L-ramnozy (**Ram1**: 500 mg, 1.505 mmol) rozpuszczonego w bezwodnym CH_2Cl_2 (15 mL) schłodzonego do temperatury 0 °C dodano kroplami BF_3OEt_2 (371 μL , 3.009 mmol) i przedmuchano argonem. Następnie zdjęto łaźnię lodową i mieszano przez 4 godz. Do reakcji dodano 3-azydopropan-1-ol (**Sub1**: 456.4 mg, 4.514 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej przez kolejne 16 godz. Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu cukrowego (TLC:

toluen:AcOEt 2:1, v/v) mieszaninę poreakcyjną przemyto nasyconym, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (10 mL), a następnie fazę wodną ekstrahowano CH₂Cl₂ (10 mL). Połączone fazy organiczne suszono nad bezwodnym MgSO₄, przesączono, zatężono na wyparce rotacyjnej i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie toluen:AcOEt (100:1, v/v). Otrzymano 460.6 mg **Ram8** z wydajnością 82%, w postaci bezbarwnego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 2:1$.

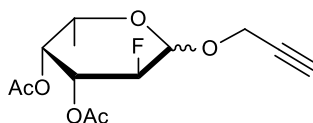


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.29-5.23 (m, 2H, H-2, H-3), 5.07 (t, 1H, $J=10.0$ Hz, H-4), 4.73 (d, 1H, $J=1.6$ Hz, H-1 β), 3.75-3.89 (m, 2H, H-5, -CH_a-), 3.46-3.53 (m, 1H, -CH_b-), 3.43 (t, 2H, $J=6.4$ Hz, -CH₂-), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.81-1.93 (m, 2H, -CH₂-), 1.23 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, H-6); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 171.59 (COCH₃), 170.34 (COCH₃), 170.12 (COCH₃), 170.10 (COCH₃), 97.78 (C-1), 92.36 (C-1), 71.24 (C-4), 70.91 (C-4), 69.98 (C-2), 69.72 (C-2), 69.24 (C-3), 69.05 (C-3), 68.92 (C-5), 66.79 (C-5), 64.73 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 48.32 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 28.90 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 21.19 (COCH₃), 20.96 (COCH₃), 20.93 (COCH₃), 18.92 (C-6), 17.61 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₅H₂₃N₃O₈: m/z 373.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 373.5.

propargilo 3,4-di-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozyd (Fuk7)

Do roztworu 1,3,4-tri-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozy (**Fuk5**: 200 mg, 0.684 mmol) w CH₂Cl₂ (10 mL) dodano alkohol propargilowy (**Sub2**: 100 μ L, 1.710 mmol) i schłodzono do temperatury 0 °C. Po 10 min dodano FeCl₃ (55.5 mg, 0.342 mmol) i mieszano w temperaturze 0 °C przez 2 godz., a następnie przez kolejne 10 godz. w temperaturze pokojowej. Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu (analiza TLC: toluen:AcOEt 2:1, v/v) mieszaninę reakcyjną ekstrahowano octanem etylu (2 x 20 mL), a następnie oddzieloną fazę organiczną przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (2 x 20 mL) i solanką (2 x 10 mL). Połączone frakcje organiczne suszono nad bezwodnym MgSO₄, przesączono i zatężono na wyparce rotacyjnej. Pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie *n*-heksan:AcOEt

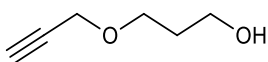
(10:1, v/v). Otrzymano 157.8 mg **Fuk7** z wydajnością 80%, w postaci jasnożółtego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 2:1$.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.77 (dd, $J=4.0$ Hz, 8.0 Hz, 1H, H-1 β), 5.43 (td, $J=3.6$ Hz, 10.4 Hz, 1H, H-3 α), 5.34 (dt, $J=1.2$ Hz, 3.6 Hz, 1H, H-3 β), 5.27 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, H-1 α), 5.13-5.20 (m, 2H, H-4 α , H-4 β), 4.94 (dd, $J=4.0$ Hz, 10.4 Hz, 1H, H-2 β), 4.79 (ddd, $J=4.0$ Hz, 10.4 Hz, 50.0 Hz, 1H, H-2 α), 4.33 (t, $J=2.8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.20-4.25 (m, 1H, H-5 α), 3.98 (dq, $J=0.8$ Hz, 6.4 Hz, 1H, H-5 β), 2.48 (t, $J=2.4$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.16 (s, 3H, OAc α), 2.07 (s, 3H, OAc β), 2.06 (s, 3H, OAc β), 2.04 (s, 3H, OAc α), 1.22 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-6 β), 1.15 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-6 α). **$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):** δ 170.41 (COCH_3), 170.22 (COCH_3), 169.97 (COCH_3), 169.20 (COCH_3), 91.77 (d, $J=24.0$ Hz, C-1), 89.36 (d, $J=22.1$ Hz, C-1), 86.53 (d, $J=64.3$ Hz, C-2), 85.67 (d, $J=67.5$ Hz, C-2), 75.78 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 75.28 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 71.74 (C-4), 71.19 (C-4), 69.51 (C-3), 69.14 (C-3), 68.66 (C-5), 67.28 (C-5), 56.04 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 55.51 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 21.07 (COCH_3), 20.78 (COCH_3), 20.71 (COCH_3), 20.67 (COCH_3), 16.02 (C-6), 15.90 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{FO}_6$: m/z 289.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 289.3.

3-prop-2-ynoksypropan-1-ol (Sub3)

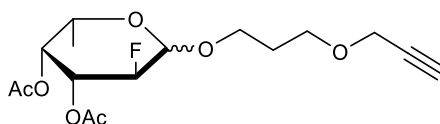
Bromek propargilu (3.726 mL, 34.827 mmol) i 1,3-propanodiol (5 mL, 69.654 mmol) mieszano przez 5 min w temperaturze 0 °C. Następnie dodano NaOH (1.672 g, 41.792 mmol), zdjęto łaźnię lodową i mieszano przez 1.5 godz. w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie mieszaninę przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przepłukując osad CHCl_3 (3 x 50 mL). Przesącz przemyto H_2O (50 mL), suszono nad bezwodnym MgSO_4 , przesączono i zatężono na wyparce rotacyjnej. Pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ (9:1, v/v). Otrzymano 4.611 g **Sub3** z wydajnością 58%, w postaci bezbarwnego oleju.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 4.16 (d, $J=2.4$ Hz, 2H, $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.77 (m, 2H, $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3.70 (t, $J=5.4$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{OH}$), 2.45 (t, $J=2.4$ Hz, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.191 (bs, 1H, $-\text{OH}$), 1.87 (quint, $J=6.0$ Hz, 11.4 Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ 79.72 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\equiv\text{CH}$), 74.61 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 68.64 (C-3), 61.25 (C-1), 58.41 ($-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 32.19 (C-2); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2$: m/z 115.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 115.7.

3-prop-2-ynoksypropylo 3,4-di-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozyd (Fuk8)

Do roztworu 1,3,4-tri-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozy (**Fuk5**: 57.8 mg, 0.197 mmol) w CH_2Cl_2 (1.5 mL) dodano 3-prop-2-ynoksypropan-1-ol (**Sub3**: 56.3 mg, 0.493 mmol) i ochłodzono do temperatury 0 °C. Po 5min do mieszaniny reakcyjnej dodano FeCl_3 (16.1 mg, 0.099 mmol) i mieszano na mieszadle magnetycznym przez 2 godz. W temperaturze 0 °C. Po tym czasie zdjęto łaźnię lodową i prowadzono reakcję przez 10 godz. w temperaturze pokojowej. Stopień przereagowania substratu kontrolowano metodą TLC (toluen:AcOEt 2:1, v/v). Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu cukrowego mieszaninę reakcyjną ekstrahowano CH_2Cl_2 (2 x 20 mL), oddzieloną fazę organiczną przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 (2 x 25 mL) oraz solanką (15 mL). Po suszeniu nad bezwodnym MgSO_4 , przesączeniu i zatężeniu na wyparce rotacyjnej surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie toluen:AcOEt (2:1, v/v). Otrzymano 35.6 mg **Fuk8** z wydajnością 52%, w postaci bezbarwnego syropu, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:1$.

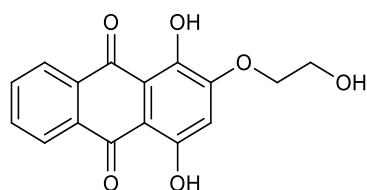


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.40 (d, $J=2.4$ Hz, H-1 α), 5.77 (dd, $J=2.8$ Hz, 5.6 Hz, H-1 β), 5.35-5.41 (m, 2H, H-3 α , H-3 β), 4.84-4.92 (m, 1H, H-4 α , H-4 β), 4.68 (dd, 1H, $J=5.6$ Hz, 6.8 Hz, H-2 β), 4.59 (dd, 1H, $J=5.2$ Hz, 6.4 Hz, H-2 α), 4.24 (q, 1H, $J=6.4$ Hz, H-5 α), 4.07 (d, $J=2.8$ Hz, 2H, $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.98 (q, 1H, $J=6.0$ Hz, H-5 β), 3.68-3.72 (m, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$), 3.54-3.57 (m, 2H, $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$), 2.42 (t, $J=2.8$ Hz, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.19 (s, 3H, OAc), 2.17 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc),

1.86-1.88 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 1.22 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6 β), 1.15 (d, 3H, $J=6.5$ Hz, H-6 α); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 170.11 (C=O), 169.85 (C=O), 169.13 (C=O), 93.71 (d, $J=26.6$ Hz, C-1), 91.69 (d, $J=24.2$ Hz, C-1), 89.24 (d, $J=64.2$ Hz, C-2), 87.62 (d, $J=64.6$ Hz, C-2), 78.51 (-O-CH₂-C \equiv CH), 74.88 (-O-CH₂-C \equiv CH), 71.23 (C-4), 70.33 (C-4), 68.81 (C-3), 68.57 (C-3), 68.45(-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 68.03 (C-5), 67.21 (C-5), 60.52 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 58.55 (-O-CH₂-C \equiv CH), 34.28 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 20.76 (COCH₃), 20.66 (COCH₃), 20.52 (COCH₃), 16.21 (C-6), 15.81 (C-6); MS(ESI): obliczone dla C₁₆H₂₃FO₇: m/z 347.2 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 347.4.

1,4-dihydrokso-2-(2-hydroksyetoxy)-anthrachinon (Sub5)

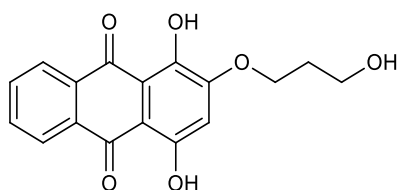
Procedura 7 [91]: Do roztworu purpuryny (**Sub4**: 200.1 mg, 0.781 mmol) w bezwodnym DMF (5 mL), dodano DBU (100.8 μ L, 0.675 mmol). Reakcj \acute e prowadzono przez 12 godz. w temperaturze 70 °C. Nast \acute epnie dodano 2-bromoetanol (83 μ L, 1.172 mmol) i kontynuowano mieszanie przez kolejne 12 godz. Przebieg reakcji monitorowano metod \acute a TLC (CHCl₃:MeOH 19:1, v/v). Po zaobserwowaniu ca \acute kowitego przereagowania substratu mieszanin \acute e poreakcyjn \acute a zat \acute eżono i rozdzielano na kolumnie chromatograficznej w uk \acute ladzie CHCl₃:MeOH (25:1, v/v). Otrzymano 145.4 mg **Sub5** z wydajno \acute sci \acute a 62%, w postaci czerwonego osadu; T.t. = 204 – 205 °C; Lit. T.t. = 205 – 206 °C [91].



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.33 (m, 2H, H-1,-OH), 13.06 (s, 2H, H-4, -OH), 8.11-8.15 (m, 2H, H-7, H-8), 7.87-7.92 (m, 2H, H-5, H-6), 6.80 (s, 1H, H-3), 4.64 (t, 1H, $J=4.8$ Hz, -O-CH₂-CH₂-OH), 4.15 (t, 2H, $J=4.4$ Hz, -O-CH₂-CH₂-OH), 3.68 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-OH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 186.92 (C-9), 185.93 (C-10), 156.31 (C-4), 153.02 (C-2), 143.69 (C-1), 133.91 (C-8a), 133.60 (C-5a), 133.12 (C-7), 132.55 (C-6), 126.93 (C-8), 126.54 (C-5), 116.12 (C-1a), 104.87 (C-3), 106.32 (C-4a), 69.87 (-O-CH₂-CH₂-OH), 60.91 (-O-CH₂-CH₂-OH); MS(ESI): obliczone dla C₁₆H₁₂O₆: m/z 301.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 301.3.

1,4-dihydroksy-2-(3-hydroksypropyloksy)anthrachinon (Sub6)

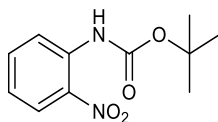
Otrzymano zgodnie z Procedurą 7. Do reakcji użyto purpurynę (**Sub4**: 200.7 mg, 0.783 mmol) oraz 3-bromopropanol (106 μ L, 1.175 mmol). Reakcję prowadzono przez 7 godz. w temperaturze 70 °C. Otrzymano 135.4 mg **Sub6** z wydajnością 55%, w postaci czerwonego osadu; **T.t.** = 165 – 167 °C; **Lit. T.t.** = 168 – 169 °C [⁹¹].



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.10 (m, 1H, H-1,-OH), 12.99 (s, 1H, H-4,-OH), 8.29-8.32 (m, 2H, H-7, H-8), 7.87-7.91 (m, 2H, H-5, H-6), 6.60 (s, 1H, H-3), 3.65 (t, 1H, $J=5.8$ Hz, -O-CH₂-CH₂-OH), 4.29 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH), 3.50 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH), 2.02 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 186.41 (C-9), 183.62 (C-10), 160.24 (C-4), 156.93 (C-2), 149.79 (C-1), 134.96 (C-8a), 134.22 (C-5a), 133.29 (C-7), 132.60 (C-6), 126.51 (C-8), 126.32 (C-5), 111.81 (C-1a), 107.84 (C-3), 105.31 (C-4a), 71.34 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-OH), 59.13 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-OH), 30.87 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-OH); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₇H₁₄O₆: m/z 315.3 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 315.5.

N-(2-nitrofenylo)karbaminian tert-butylu (Sub10)

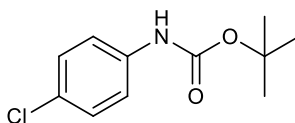
Procedura 8 [⁹²]: Do roztworu 2-nitroaniliny (**Sub7**: 500.2 mg, 3.620 mmol) w bezwodnym metanolu (5 mL) dodano Boc₂O (915 μ L, 3.982 mmol). Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym przez 5 godz., w temperaturze wrzenia. Przebieg reakcji monitorowano metodą TLC (*n*-heksan:AcOEt 4:1, v/v). Po zaobserwowaniu zaniku substratu mieszaninę reakcyjną zateżono na wyparce rotacyjnej. Otrzymano 655.4 mg **Sub10** z wydajnością 76 %, w postaci pomarańczowego osadu, który bez dodatkowego oczyszczania zastosowano w kolejnej syntezie; **T.t.** = 75.2 – 77.1 °C; **Lit. T.t.** = 77.9 – 81.2 °C [¹¹⁷].



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.11 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H-3), 7.35 (t, 1H, $J=8.0$ Hz, H-5), 6.81 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H-4), 6.69 (t, 1H, $J=8.0$ Hz, H-6), 6.07 (s, 1H, -NH-), 1.62 (s, 9H, -CH₃); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 152.56 (-COO-), 142.45 (C-1), 136.21 (C-5), 130.80 (C-2), 125.82 (C-3), 120.07 (C-4), 115.98 (C-6), 28.42 (C(CH₃)₃); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₁H₁₄N₂O₄: m/z 239.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 239.3.

N-(4-chlorofenylo)karbaminian tert-butylu (Sub11)

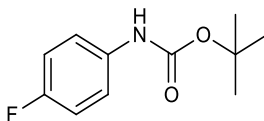
Otrzymano zgodnie z Procedurą 8. Do reakcji użyto 4-chloroanilinę (**Sub8**: 501.4 mg, 3.930 mmol). Otrzymano 456.4 mg **Sub11** z wydajnością 51%, w postaci żółtawego osadu; **T.t.** = 95.1 – 97.2 °C; **Lit. T.t.** = 97 °C [¹¹⁸].



¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.48 (d, 2H, $J=4.0$ Hz, H-3, H-5), 7.30 (m, 2H, H-2, H-6), 6.49 (s, 1H, -NH-), 1.51 (s, 9H, -CH₃); **¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 152.72 (-COO-), 138.51 (C-1), 128.50 (C-3, C-5), 125.64 (C-4), 119.57 (C-2, C-6), 28.18 (C(CH₃)₃); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₁H₁₄ClNO₂: m/z 228.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 228.4.

N-(4-fluorofenylo)karbaminian tert-butylu (Sub12)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 8. Do reakcji użyto 4-fluoroanilinę (**Sub9**: 536.5 mg, 4.828 mmol). Otrzymano 999.5 mg **Sub12** z wydajnością 98%, w postaci białego osadu; **T.t.** = 119 – 124 °C; **Lit. T.t.** = 124 – 125 °C [¹¹⁹].

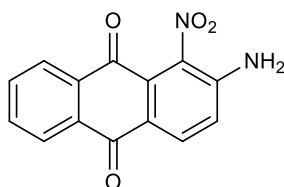


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.50 (m, 2H, H-3, H-5), 6.61 (m, 2H, H-2, H-6), 6.50 (s, 1H, -NH-), 1.51 (s, 9H, - CH_3); ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 152.33 (- COO -), 162.98 (C-4), 133.61 (C-1), 115.70 (C-3, C-5), 115.45 (C-2, C-6), 28.27 (C(CH_3) $_3$); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{FNO}_2$: m/z 234.1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; wyznaczone m/z 234.6.

2-amino-1-nitroantrachinon (Sub13)

Metoda 1: Do 2-nitroaniliny (**Sub7**: 100.6 mg, 0.728 mmol) w kwasie metanosulfonowym (2 mL) dodano bezwodnik ftalowy (183.3 mg, 1.238 mmol) i bezwodny AlCl_3 (19.5 mg, 0.146 mmol). Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w temperaturze 100 °C, kontrolując stopień przereagowania substratu metodą TLC (*n*-heksan:AcOEt 4:1, v/v). Po 1 godz. zaobserwowano skomplikowaną mieszaninę produktów, której zdecydowano się nie rozdzielać.

Procedura 9 [⁹²]: Do roztworu *N*-(2-nitrofenylo)kARBAMINIAnu *tert*-butylu (**Sub10**: 403.8 mg, 1.695 mmol) w kwasie metanosulfonowym (3 mL) dodano bezwodnik ftalowy (426.9 mg, 2.882 mmol) i bezwodny AlCl_3 (45.2 mg, 0.339 mmol). Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w temperaturze 100 °C przez 3 godz. Przebieg reakcji kontrolowano metodą TLC (*n*-heksan:AcOEt 4:1, v/v). Po zaobserwowaniu zaniku substratu mieszaninę reakcyjną wylano na 25 mL lodu, zneutralizowano nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 i ekstrahowano CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Fazę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO_4 , przesączono i zatężono na wyparce rotacyjnej. Otrzymany surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie *n*-heksan:AcOEt (20:1, v/v). Otrzymano 318.2 mg **Sub13** co stanowi 70% wydajności, w postaci pomarańczowego bezpostaciowego ciała stałego.

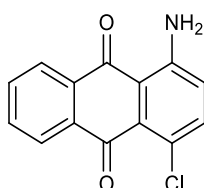


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.11 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H-4), 7.34 (t, 2H, $J=8.0$ Hz, H-6, H-7), 6.81 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H-3), 6.8 (t, 2H, $J=8.0$ Hz, H-5, H-8), 6.07 (s, 2H, - NH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 167.87 (C-9), 162.94 (C-10), 144.66 (C-2), 137.92 (C-1), 136.91 (C-1a), 135.90 (C-4), 135.59 (C-5a, C-8a), 127.33 (C-6, C-7), 126.29 (C-5, C-8), 118.78

(C-4a), 116.97 (C-3); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₄H₈N₂O₄: m/z 291.2 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 291.4.

1-amino-4-chloroantrachinon (Sub14)

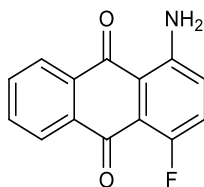
Otrzymano zgodnie z Procedurą 9. Do reakcji użyto *N*-(4-chlorofenylo)karbaminian *tert*-butylu (**Sub11**: 402.1 mg, 1.766 mmol). Reakcję prowadzono na mieszadło magnetycznym przez 30 min. Otrzymano 391.3 mg **Sub14** z wydajnością 86%, w postaci brązowego bezpostaciowego ciała stałego.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.64 (m, 2H, H-6, H-7), 7.58 (m, 2H, H-5, H-8), 7.54 (m, 1H, H-3), 7.36 (m, 1H, H-2), 5.75 (s, 2H, -NH₂); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 185.67 (C-9), 180.66 (C-10), 147.20 (C-1), 133.92 (C-5a, C-8a), 131.81 (C-3), 131.25 (C-6, C-7), 129.37 (C-4a), 125.01 (C-5, C-8), 124.43 (C-4), 121.47 (C-2), 117.07 (C-1a); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₄H₈ClNO₂: m/z 258.0 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 258.8.

1-amino-4-fluoroantrachinon (Sub15)

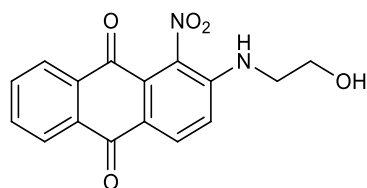
Reakcję prowadzono zgodnie z Procedurą 9. Do reakcji użyto *N*-(4-fluorofenylo)karbaminian *tert*-butylu (**Sub12**: 400.2 mg, 1.895 mmol). Po 12 godz. prowadzenia reakcji, nie obserwując postępu reakcji, postanowiono ją zakończyć.



2-(2-hydroksyetyloamino)-1-nitroantrachinon (Sub16)

Procedura 10 [⁹⁴]: Do roztworu 2-amino-1-nitroantrachinonu (**Sub13**: 200.5mg, 0.747 mmol) w bezwodnym MeOH (3 mL) wkroplono 2-bromoetanol (52.9 μL, 0.747 mmol).

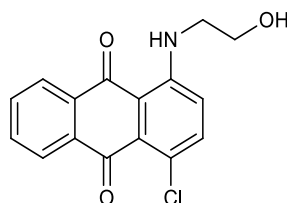
Reakcję prowadzono w atmosferze argonu, na mieszadło magnetycznym, w temperaturze wrzenia przez 8 godz. Po zaobserwowaniu zaniku substratu (analiza TLC: *n*-heksan:AcOEt 2:1, v/v) do mieszaniny reakcyjnej dodano eter dietylowy (10 mL). Wykryształowany osad produktu odsączono, a przesącz zatężono na wyparce rotacyjnej, a otrzymany produkt połączono z osadem. Otrzymano 200.7 mg **Sub16** z wydajnością 86%, w postaci pomarańczowego oleju.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.12 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H-4), 7.36 (m, 2H, H-6, H-7), 6.81 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H-3), 6.71 (m, 2H, H-5, H-8), 3.92 (m, 3H, $-\text{CH}_2$, $-\text{NH}_2$), 3.54 (m, 3H, $-\text{CH}_2$, $-\text{OH}$); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 182.28 (C-9), 182.15 (C-10), 150.19 (C-2), 135.30 (C-1a), 135.62 (C-1a), 132.41 (C-4), 131.66 (C-5a, C-8a), 130.79 (C-6, C-7), 126.29 (C-5, C-8), 118.72 (C-4a), 116.99 (C-3), 62.80 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 35.97 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$: m/z 313.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 313.7.

4-chloro-1-(2-hydroksyetyloamino)-antrachinon (Sub17)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 10. Do reakcji użyto 1-amino-4-chloroantrachinonu (**Sub14**: 199.8 mg, 0.775 mmol). Otrzymano 201.2 mg **Sub17** z wydajnością 74%, w postaci brązowego osadu; **T.t.** = 162 – 164 °C; **Lit. T.t.** = 164 – 166 °C ^[120].



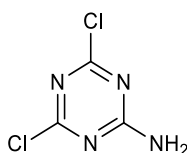
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.15 (m, 2H, H-6, H-7), 7.56 (m, 2H, H-5, H-8), 6.87 (m, 1H, H-3), 6.95 (m, 1H, H-2), 3.89 (m, 3H, $-\text{CH}_2$, $-\text{NH}$), 3.50 (m, 3H, $-\text{CH}_2$, $-\text{OH}$); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 185.21 (C-9), 184.16 (C-10), 143.53 (C-1), 133.87 (C-5a, C-8a), 130.28 (C-3), 127.88 (C-6, C-7), 129.99 (C-4a), 128.83 (C-5, C-8), 124.85 (C-4), 120.10

(C-2), 112.12 (C-1a), 61.47 (-NH-CH₂-CH₂-OH), 45.63 (-NH-CH₂-CH₂-OH); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₆H₁₂ClNO₃: m/z 324.0 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 324.9.

2-amino-4,6-dichloro-1,3,5-triazyna (Sub19) [95]

Metoda 1: Roztwór 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (**Sub18**: 1 g, 5.423 mmol) w acetonie (5 mL) schłodzone w łaźni wodno-lodowej do temperatury 0 °C i mieszano przez 15 min. Następnie wkroplono 25% roztwór wody amoniakalnej (4.697 mL, 0.030 mmol) i mieszano do osiągnięcia temperatury 5 °C przez 30 min. Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu (analiza TLC: CHCl₃:MeOH 10:1, v/v) mieszaninę reakcyjną przesączone pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie surowy produkt rekrytalizowano z wody i liofilizowano. Otrzymano 545.7 mg **Sub19** z wydajnością 61%, w postaci białego ciała stałego; **T.t.** = 235 – 236°C; **Lit. T.t.** = 235 – 236 °C [121].

Procedura 11: Do roztworu 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (**Sub18**: 1 g, 5.423 mmol) w CH₂Cl₂ (10 mL) wkroplono 25% roztwór wody amoniakalnej (4.697 mL, 0.030 mol) i mieszano przez 1.5 godz. w temperaturze nie przekraczającej 5 °C. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC (CHCl₃:MeOH 10:1, v/v). Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce rotacyjnej, a produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl₃:MeOH (19:1, 10:1, v/v). Otrzymano 787.2 mg **Sub19** z wydajnością 88%, w postaci białego ciała stałego; **T.t.** = 236 – 238°C; **Lit. T.t.** = 235 – 236 °C [121].

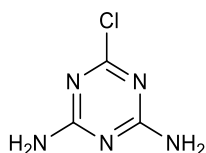


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.86 (bs, 2H, -NH₂); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 173.23 (C-2), 171.1 (C-4, C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₃H₂Cl₂N₄: m/z 165.0 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 165.5.

4,6-diamino-2-chloro-1,3,5-triazyna (Sub20) [95]

Do zwiesiny 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (**Sub18**: 2.5 g, 13.557 mmol) w acetonie (20 mL) dodano 25% roztwór wody amoniakalnej (5.3 mL, 2.322 mmol) i mieszano

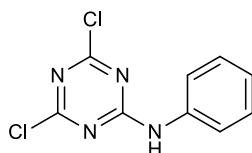
na mieszadłe magnetycznym przez 1 godz. w temperaturze nie przekraczającej 5 °C. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC (CHCl₃:MeOH 10:1, v/v). Po zaobserwowaniu zaniku substratu mieszaninę reakcyjną przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany osad przemyto wodą (5 x 10 mL) i zliofilizowano. Otrzymano 1.697 g **Sub20** z wydajnością 83%, w postaci białego ciała stałego; **T.t.** > 300 °C; **Lit. T.t.** = 300 °C [122].



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.18 (d, *J*=30.8 Hz, 4H, -NH₂); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 170.69 (C-6), 168.61 (C-2), 167.18 (C-4); **MS(ESI):** obliczone dla C₃H₄ClN₅: *m/z* 146.0 [M+H]⁺; wyznaczone *m/z* 146.3.

2,4-dichloro-6-fenylamino-1,3,5-triazyna (Sub21) [96]

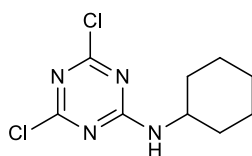
Do roztworu 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (**Sub18**: 1 g, 5.423 mmol) w acetonie (15 mL) schłodzonego do temperatury 5 °C wprowadzono NaOH (216.9 mg, 5.423 mmol) oraz anilinę (495 μL, 5.423 mmol). Reakcję prowadzono na mieszadłe magnetycznym w temperaturze 0 °C przez 1.5 godz. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC (*n*-heksan:AcOEt 2:1, v/v). Po zaobserwowaniu zaniku substratu rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej i dodano zimną wodę (20 mL). Otrzymaną mieszaninę przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Osad przemyto wodą (3 x 20 mL), który następnie zliofilizowano. Otrzymano 1.111 g **Sub21** z wydajnością 85%, w postaci żółtego ciała stałego; **T.t.** = 136 – 138 °C; **Lit. T.t.** = 136 – 138 °C [96].



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.68 (s, 1H, NH), 7.49-7.53 (m, 1H, -Ph), 7.40-7.44 (m, 2H, -Ph), 7.19-7.23 (m, 2H, -Ph); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 171.24 (C-4, C-6), 164.38 (C-2), 135.89 (-Ph), 129.44 (-Ph), 126.01 (-Ph), 121.55 (-Ph); **MS(ESI):** obliczone dla C₉H₆Cl₂N₄: *m/z* 241.0 [M+H]⁺; wyznaczone *m/z* 241.3.

2,4-dichloro-6-cykloheksyloamino-1,3,5-triazyna (Sub22)

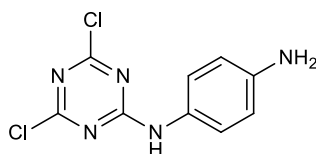
Procedura 12 [97]: 2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazynę (**Sub18**: 1 g, 5.423 mmol) rozpuszczono w CH₂Cl₂ (20 mL), małymi porcjami dodano mieszaninę cykloheksyloaminy (618 µL, 5.423 mmol) i DIPEA (1.039 mL, 5.965 mmol) w CH₂Cl₂ (3 mL). Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w temperaturze 5 °C. Przebieg reakcji kontrolowano metodą TLC (*n*-heksan:AcOEt 2:1, v/v). Po 2 godz. reakcję zakończono, mieszaninę poreakcyjną przemyto 1M HCl (10 mL) i wodą (3 x 10 mL). Fazę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO₄, przesączono i zatężono na wyparce rotacyjnej. Produkt wydzielono na kolumnie chromatograficznej w układzie rozpuszczalników *n*-heksan:AcOEt (10:1, v/v). Otrzymano 938.1 mg **Sub22** z wydajnością 70%, w postaci krzepnącego, bezbarwnego syropu.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.72-5.76 (m, 1H, -NH-), 3.92-3.95 (m, 1H, -CH-), 1.98-2.01 (m, 2H, -CH₂-), 1.69-1.73 (m, 2H, -CH₂-), 1.63-1.66 (m, 2H, -CH₂-), 1.41-1.43 (m, 2H, -CH₂-), 1.23-1.25 (m, 2H, -CH₂-); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.02 (C-4), 171.16 (C-6), 165.19 (C-2), 50.43 (CH), 32.60 (-CH₂-), 25.44 (-CH₂-), 24.58 (-CH₂-); MS(ESI): obliczone dla C₉H₁₂Cl₂N₄: m/z 247.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 247.6.

6-(4-aminofenylamino)-2,4-dichloro-1,3,5-triazyna (Sub23) [98]

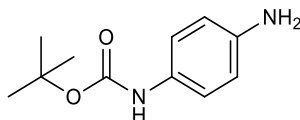
Do roztworu *p*-fenylenodiaminy (586.4 mg, 5.423 mmol) w THF (30 mL), dodano NaHCO₃ (911.2 mg, 10.846 mmol), a następnie roztwór 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (**Sub18**: 1 g, 5.423 mmol) w THF (3 mL). Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w temperaturze 5 °C przez 1 godz. Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu (analiza TLC: *n*-heksan:AcOEt 2:1, v/v) mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce rotacyjnej. Pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie rozpuszczalników *n*-heksan:AcOEt (6:1, v/v). Otrzymano 486.1 mg **Sub23** z wydajnością 30%, w postaci żółtego ciała stałego; T.t. > 260 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.17 (s, 1H, -NH-), 7.60 (s, 4H, -Ph), 7.56 (s, 2H, -NH₂);
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 170.83 (C-4, C-6), 166.18 (C-2), 135.80 (-Ph), 132.24 (-Ph), 121.67 (-Ph), 118.92 (-Ph); **MS(ESI):** obliczone dla C₉H₇Cl₂N₅: m/z 278.0 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 278.3.

N-Boc-4-fenylendiamina (Sub24) [⁹⁹]

Do roztworu *p*-fenylenodiaminy (500 mg, 4.624 mmol) w CH₂Cl₂ (5 mL) wkroplono Boc₂O (531 μ L, 2.312 mmol). Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w temperaturze 5 °C przez 4 godz. Po zaobserwowaniu zaniku substratu (analiza TLC: *n*-heksan:AcOEt 1:1, v/v) mieszaninę poreakcyjną zatężono na wyparce rotacyjnej. Produkt wydzielono na kolumnie chromatograficznej w układzie *n*-heksan:AcOEt (2:1, v/v). Otrzymano 548.8 mg **Sub24** z wydajnością 57%, w postaci pomarańczowego ciała stałego; **T.t.** = 109 – 111 °C; **Lit. T.t.** = 114 – 116 °C [¹²³].

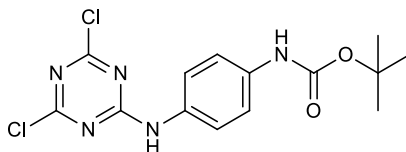


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.99-7.12 (m, 1H, -NH-COO-), 6.58-6.62 (m, 4H, -Ph), 6.29 (s, 2H, -NH₂), 1.50 (s, 9H, -CH₃); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 153.52 (-NH-COO-), 142.55 (-Ph), 129.98 (-Ph), 121.16 (-Ph), 115.79 (-Ph), 80.18 (C-CH₃), 28.58 (-CH₃); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₁H₁₆N₂O₂: m/z 209.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 209.5.

6-(4-N-Boc-fenylenoamino)-2,4-dichloro-1,3,5-triazyna (Sub25) [⁹⁸]

Do roztworu 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (**Sub18**: 586.4 mg, 5.423 mmol) w THF (30 mL), dodano NaHCO₃ (442.7 mg, 5.270 mmol), a następnie roztwór **Sub24** (548.8 mg, 2.635 mmol) w THF (2 mL). Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w temperaturze 0 °C przez 2 godz. Po zaobserwowaniu zaniku substratu (analiza TLC: *n*-heksan:AcOEt 2:1, v/v) mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce rotacyjnej.

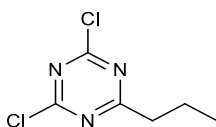
Pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie rozpuszczalników *n*-heksan:AcOEt (5:1, v/v). Otrzymano 666.2 mg **Sub25** z wydajnością 76%, w postaci białego ciała stałego; **T.t.** = 120.1 – 122.3 °C.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.63 (s, 1H, -NH-COO-), 7.37-7.41 (m, 4H, -Ph), 6.56 (s, 1H, -NH-), 1.51 (s, 9H, -CH₃); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 171.53 (C-4), 170.38 (C-6), 164.30 (C-2), 152.93 (-NH-COO-), 136.47 (-Ph), 130.82 (-Ph), 122.60 (-Ph), 119.47 (-Ph), 81.14 (C-CH₃), 28.50 (-CH₃); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₄H₁₅Cl₂N₅O₂: m/z 356.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 356.4.

2,4-dichloro-6-propylo-1,3,5-triazyna (Sub26) [¹⁰¹]

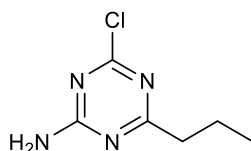
Do zawiesiny wiórków magnezu (262.8 mg, 10.844 mmol) w eterze dietylowym (15 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono 3-bromopropan (981 μL, 10.844 mmol). Następnie zdjęto łaźnię lodową i podgrzano, prowadząc reakcję w temperaturze wrzenia przez 30 min, ochłodzono do temperatury pokojowej i dodano do roztworu 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyny (**Sub18**: 500.0 mg, 2.711 mmol) w CH₂Cl₂ (20 mL) ochłodzonego do temperatury -20 °C. Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w temperaturze -20 °C. Przebieg reakcji kontrolowano metodą TLC (*n*-heksan:AcOEt 10:1, v/v). Po 4 godz. zakończono reakcję, dodając do mieszaniny reakcyjnej wodę (10 mL) i ogrzano ją do temperatury pokojowej. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahowano CH₂Cl₂ (20 mL), ekstrakt przemyto wodą (6 x 10 mL). Fazę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO₄, przesączono i zatężono na wyparce rotacyjnej. Otrzymano 381.1 mg **Sub26** z wydajnością 73%, w postaci żółtego syropu.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 2.75-2.83 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1.80-1.84 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 0.97-1.01 (m, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 184.26 (C-6), 172.73 (C-2), 171.92 (C-4), 40.68 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 21.10 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 13.89 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_6\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_3$: m/z 192.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 192.4.

4-amino-2-chloro-6-propylo-1,3,5-triazyna (Sub27) ^[101]

Otrzymano zgodnie z Procedurą 11. Do reakcji użyto 2,4-dichloro-6-propylo-1,3,5-triazynę (**Sub26**: 150.2 mg, 0.781 mmol). Otrzymano 83.6 mg **Sub27** z wydajnością 62%, w postaci żółtego oleju.



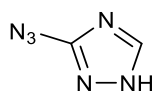
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.84 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$), 2.74-2.82 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1.79-1.85 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 0.95-1.02 (m, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 183.19 (C-6), 173.52 (C-4), 167.81 (C-2), 41.13 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 21.16 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 14.51 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_6\text{H}_9\text{ClN}_4$: m/z 173.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 173.6.

3-azydo-1H-1,2,4-triazol (Sub29)

Metoda 1^[102]: Do zawiesiny 3-amino-1H-1,2,4-triazolu (**Sub28**: 150 mg, 1.784 mmol) w 20% HCl (5.5 mL), ochłodzonego do temperatury 0 °C, dodano niewielkimi porcjami roztwór NaNO_2 (135.4 mg, 1.962 mmol) w H_2O (2 mL) i mieszano przez 30 min. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wkroplono roztwór NaN_3 (145.0 mg, 2.230 mmol) w H_2O (3 mL). Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 1 godz., kontrolując jej przebieg metodą TLC ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1, v/v). Otrzymano skomplikowaną mieszaninę produktów, której zdecydowano się nie rozdzielać.

Procedura 13^[103]: Do roztworu 3-amino-1H-1,2,4-triazolu (**Sub28**: 150 mg, 1.784 mmol) w 20% H_2SO_4 (2 mL), schłodzonego do temperatury 0 °C, wkroplono roztwór NaNO_2 (122.9 g, 1.784 mmol) w H_2O (3 mL). Mieszaninę reakcyjną mieszano na mieszadle

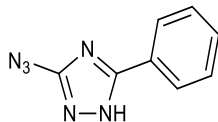
magnetycznym przez 30 min w temperaturze 0 °C. Następnie dodano mocznik (10.7 mg, 0.178 mmol) oraz roztwór NaN₃ (150.8 mg, 2.319 mmol) w H₂O (24 mL), usunięto łąźnię wodno-lodową i kontynuowano mieszanie w temperaturze pokojowej przez kolejne 30 min. Przebieg reakcji kontrolowano metodą TLC (aceton:*n*-heksan 1:1, v/v). Po stwierdzeniu zaniku substratu, mieszaninę reakcyjną zneutralizowano do pH=6 przy użyciu nasyconego, wodnego roztworu NaHCO₃. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahowano octanem etylu (3 x 15 mL), a oddzieloną fazę organiczną przemyto wodą (2 x 15 mL), suszono nad bezwodnym MgSO₄, przesączono i zatężono na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl₃:MeOH (9:1, v/v) otrzymując 102.1 mg **Sub29** w postaci jasnożółtych kryształów z wydajnością 52%; **T.t.** = 118.3 – 119.8 °C; **Lit. T.t.** = 120 – 121.5 °C [124].



¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.01 (s, 1H, -NH-), 8.50 (s, 1H, Ar); **¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 157.05 (C-N₃), 144.82 (C-H); **MS(ESI):** obliczone dla C₂H₄N₄: m/z 85.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 85.7.

3-azydo-5-fenyl-1H-1,2,4-triazol (Sub31)

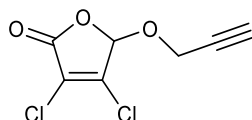
Otrzymano zgodnie z Procedurą 13. Do reakcji użyto 3-amino-5-fenyl-1H-1,2,4-triazol (**Sub30**: 150 mg, 0.936 mmol). Otrzymano 75.0 mg **Sub31** z wydajnością 43%, w postaci białego osadu; **T.t.** = 190.3 – 192.1 °C; **Lit. T.t.** = 191 – 192 °C [124].



¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.35 (bs, 1H, -NH-), 7.95-7.96 (m, 2H, -Ph), 7.53-7.55 (m, 3H, -Ph); **¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 157.53 (C-N₃), 154.96 (C-Ph), 130.79 (-Ph), 129.21 (-Ph), 126.03 (-Ph); **MS(ESI):** obliczone dla C₈H₆N₆: m/z 187.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 187.5.

3,4-dichloro-5-propargiloksyfuran-2(5H)-on (Sub33) ^[104]

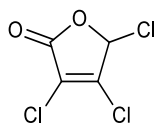
Do roztworu 3,4-dichloro-furan-2(5H)-onu (**Sub32**: 1.500 g, 8.878 mmol) rozpuszczonego w toluenie (15 mL) dodano kroplami alkohol propargilowy (775 μ L, 13.317 mmol) i 95% H₂SO₄ (d = 1.84 g/mL, 24 μ L, 0.432 mmol). Kolbę z mieszaniną reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 30 min na mieszadle magnetycznym pod chłodnicą zwrotną zaopatrzoną w rurkę chlorowapniową. Po zaobserwowaniu zaniku substratu (TLC: *n*-heksan:AcOEt 1:1, v/v) mieszaninę zobojętniono przez przemycie wodnym roztworem NaHCO₃, fazy rozdzielono, a następnie fazę organiczną osuszono bezwodnym MgSO₄, przesączono i zatężono na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelem krzemionkowym jako eluent stosując toluen, otrzymując 1.452 g **Sub33** w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 79%.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.06 (s, 1H, H-5), 4.51-4.53 (m, 2H, -CH₂-), 2.64 (t, *J*=2.4 Hz, 1H, \equiv CH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 163.15 (C-2), 147.52 (C-4), 124.77 (C-3), 98.65 (C-5), 77.89 (-CH₂-C \equiv CH), 76.82 (-CH₂-C \equiv CH), 57.44 (-CH₂-C \equiv CH); MS(ESI): obliczone dla C₇H₄Cl₂O₃: m/z 207.0 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 207.8.

3,4,5-trichlorofuran-2(5H)-on (Sub34) ^[104]

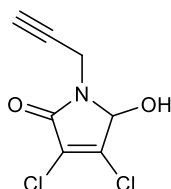
Do 3,4-dichloro-furan-2(5H)-onu (**Sub32**: 2.0 g, 11.837 mmol) w SOCl₂ (7.891 mL, 0.109 mol) wkropiono DMF (300 μ L, 3.895 mmol). Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w temperaturze 70 °C przez 5 godz. Po zaobserwowaniu zaniku substratu (TLC: *n*-heksan:AcOEt 1:1, v/v) mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej. Pozostałość SOCl₂ usunięto przez odparowanie z toluenem na wyparce rotacyjnej, otrzymując 1.974 g **Sub34** w postaci jasnożółtego oleju z wydajnością 89%.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CHCl_3): 6.53 (s, 1H, H-5); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): 162.26 (C-2), 150.38 (C-4), 123.75 (C-3), 85.93 (C-5); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_4\text{HCl}_3\text{O}_2$: m/z 208.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; wyznaczone m/z 209.2.

3,4-dichloro-5-hydroksy-1-propargilo-1H-pirol-2(5H)-on (Sub35) ^[104]

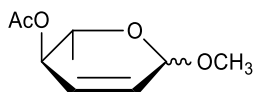
Do 3,4,5-trichlorofuran-2(5H)-onu (**Sub34**: 1.0 g, 5.336 mmol) dodano 1,4-dioksan (30 mL), następnie stopniowo wkraplano propargiloaminę (752 μL , 11.739 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej, na mieszadle magnetycznym przez 24 godz. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC (*n*-heksan:AcOEt 1:1, v/v). Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu reakcję wylano do nasyconego roztworu NH_4Cl (10 mL) i ekstrahowano octanem etylu (3 x 7 mL). Fazę organiczną przemyto solanką (3 x 10 mL), następnie suszono nad bezwodnym MgSO_4 , przesączono i zatężono na wyparce rotacyjnej. Oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie toluen:AcOEt 5:1 (v/v). Otrzymano 494.7 mg **Sub35** w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 45%; **T.t.** = 106.8 – 107.8 °C.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.25 (d, $J=9.4$ Hz, 1H, $-\text{OH}$), 5.47 (d, $J=9.4$ Hz, 1H, H-5), 4.32 (dd, $J=17.9$ Hz, 2.5 Hz, 1H, $>\text{N}-\text{CH}_{2b}-\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.95 (dd, $J=17.9$ Hz, 2.5 Hz, 1H, $>\text{N}-\text{CH}_{2a}-\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.26 (t, $J=2.5$ Hz, 1H, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 161.17 (C-2), 145.09 (C-4), 124.45 (C-3), 81.20 (C-5), 78.52 ($-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 74.58 ($-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 29.15 ($-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_7\text{H}_5\text{Cl}_2\text{NO}_2$: m/z 206.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 206.7.

metrylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram9)

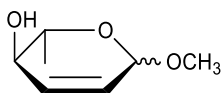
Otrzymano zgodnie z Procedura 5. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 100.2 mg, 0.468 mmol). Otrzymano 62.7 mg **Ram9** z wydajnością 72%, w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 2:1$.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.96-5.76 (m, 2H, H-2 β , H-2 α , H-3 α , H-3 β), 5.03 (m, 2H, H-4 α , H-4 β), 4.84 (bs, 2H, 2 x H-1), 3.92 (m, 1H, H-5 α), 3.84 (m, 1H, H-5 β), 3.44 (s, 3H, -OCH $_3\beta$), 3.42 (s, 3H, -OCH $_3\alpha$), 2.06 (s, 6H, 2 x OAc), 1.30 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6 β), 1.22 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6 α); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 170.62 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3\alpha$), 170.55 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3\beta$), 130.32 (C-3 β), 129.97 (C-3 α), 128.04 (C-2 β), 127.87 (C-2 α), 96.98 (C-1 β), 95.54 (C-1 α), 71.45 (C-5 β), 71.02 (C-5 α), 69.61 (C-4 β), 64.99 (C-4 α), 55.94 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3\alpha$), 55.02 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3\beta$), 21.28 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.09 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 18.76 (C-6 β), 18.11 (C-6 α); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_4$: m/z 187.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 187.6.

metrylo 2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram10)

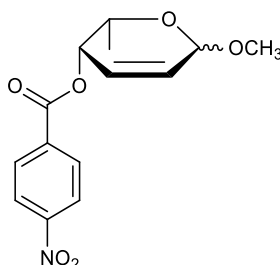
Procedura 14^[86]: *Etap 1*: Do roztworu metylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozydu (**Ram9**: 62.7 mg, 0.337 mmol) w metanolu (2 mL) wdroplono 1M roztwór MeONa w MeOH (500 μL , 0.500 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 godz. kontrolując jej przebieg metodą TLC (toluen:AcOEt 2:1, v/v). Po zaobserwowaniu zaniku substratu mieszaninę reakcyjną zneutralizowano Amberlitem, następnie nośnik odsączono, a przesącz zatężono na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie *n*-heksan:AcOEt (3:1, v/v), otrzymując 38.8 mg **Ram10** z wydajnością 80%, w postaci bezbarwnego krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 4:1$.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.96 (m, 2H, H-2β, H-3β), 5.73 (m, 2H, H-2α, H-3α), 5.10 (bs, 1H, H-1β), 4.86 (bs, 1H, H-1α), 3.89 (dd, 1H, *J*=1.6 Hz, 8.8 Hz, H-4β), 3.82 (dd, 1H, *J*=1.6 Hz, 8.8 Hz, H-4α), 3.63 (m, 2H, 2×H-5), 3.46 (s, 3H, OCH₃(β)), 3.42 (s, 3H, OCH₃(α)), 2.46 (bs, 2H, 2×CH-OH), 1.36 (d, 3H, *J*=6.4 Hz, H-6β), 1.32 (d, 3H, *J*=5.6 Hz, H-6α); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 134.03 (C-3β), 133.86 (C-3α), 126.82 (C-2β), 126.58 (C-2α), 97.57 (C-1β), 95.43 (C-1α), 70.75 (C-5β), 69.61 (C-5α), 68.62 (C-4 β), 68.18 (C-4α), 55.79 (CH₃O(α)), 55.10 (CH₃O(β)), 18.48 (C-6β), 18.15 (C-6α); **MS(ESI):** obliczone dla C₇H₁₂O₃: *m/z* 145.1 [M+H]⁺; wyznaczone *m/z* 145.3.

metyle 4-nitrobenzoilo-2,3,6-trideoksy-L-treo-heks-2-enopiranozyd (Fuk9)

Procedura 14 [86]: *Etap 2:* Otrzymany **Ram10** (37.1 mg, 0.257 mmol) w THF (2 mL) ochłodzono na łaźni lodowej i mieszano przez 10 min w temperaturze 0 °C. Do roztworu dodano kwas 4-nitrobenzoesowy (65.0 mg, 0.389 mmol) oraz PPh₃ (104.1 mg, 0.397 mmol), a następnie zdjęto łaźnię lodową i kontynuowano mieszanie w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie wkroplono 40% roztwór DEAD w toluenie (173 μL, 0.397 mmol) i dalej mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godz. kontrolując jej przebieg metodą TLC (toluen:AcOEt 2:1, v/v). Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu cukrowego mieszaninę poreakcyjną zatężono na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie *n*-heksan:AcOEt (25:1, v/v) otrzymując 55.6 mg **Fuk19** z wydajnością 78%, w postaci bezbarwnego krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów α:β = 20:1.



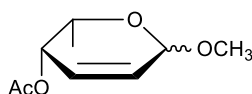
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.28 (m, 8H, -Ph), 6.20 (m, 2H, H-2β, H-3β), 6.10 (m, 2H, *J*=3.2 Hz, 10.0 Hz, H-2α, H-3α), 5.17 (dd, 1H, *J*=2.8 Hz, 5.6 Hz, 2×H-4), 5.09 (d, 1H, *J*=1.2 Hz, H-1β), 4.98 (d, 1H, *J*=3.2 Hz, H-1α), 4.35 (qd, 1H, *J*=2.4 Hz, 6.8 Hz, 13.2 Hz,

H-5 α), 4.03 (qd, 1H, $J=2.8$ Hz, 6.8 Hz, 13.2 Hz, H-5 β), 3.55 (s, 3H, OCH₃(β)), 3.48 (s, 3H, OCH₃(α)), 1.35 (d, 3H, $J=6.8$ Hz, H-6 β), 1.32 (d, 3H, $J=6.8$ Hz, H-6 α); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.46 (OC=O), 150.83 (-Ph), 135.48 (-Ph), 133.67 (-Ph), 131.01 (C-3), 125.45 (C-2), 123.76 (-Ph), 95.46 (C-1), 67.83 (C-5 β), 66.82 (C-5 α), 64.75 (C-4), 55.98 (CH₃O), 16.44 (C-6); MS(ESI): obliczone dla C₁₄H₁₅NO₆: m/z 294.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 294.3.

metyle 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-treo-heks-2-enopiranozyd (Fuk10)

Procedura 14^[86]: *Etap 3*: Do **Fuk9** (55.6 mg, 0.190 mmol) w MeOH (2 mL) wkroplono 1M roztwór MeONa w MeOH (500 μ L, 0.500 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 godz., kontrolując jej przebieg metodą TLC (toluen:AcOEt 2:1, v/v). Po zaobserwowaniu całkowitego przereagowania substratu cukrowego mieszaninę reakcyjną zneutralizowano Amberlitem, następnie nośnik odsączono, a przesącz zatężono na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie *n*-heksan:AcOEt (3:1, v/v) otrzymując 28.9 mg **Fuk9a** z wydajnością 87%, w postaci krzepnącego bezbarwnego oleju, jako mieszaninę anomerów α : β = 16:1.

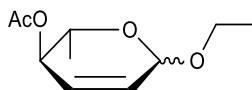
Etap 4: Do **Fuk9a** (28.9 mg, 0.200 mmol) w CH₂Cl₂ (2 mL) dodano bezwodnik octowy (21 μ L, 0.221 mmol), TEA (46 μ L, 0.332 mmol) oraz DMAP (5.8 mg, 0.057 mmol) i mieszano przez 18 godz. w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolowano metodą TLC (toluen:AcOEt 2:1, v/v). Po zaobserwowaniu zaniku substratu cukrowego mieszaninę rozcieńczono CH₂Cl₂ (5 mL), przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (3 x 5 mL) oraz solanką (3 x 5 mL). Oddzieloną fazę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO₄, przesączono i zatężono na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie toluen:AcOEt (20:1, v/v), otrzymując 35.8 mg **Fuk10** z wydajnością 96%, w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów α : β = 7:1.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.04-6.10 (m, 4H, H-2 α , H-2 β , H-3 α , H-3 β), 5.01 (t, 1H, J =2.7 Hz, H-1 β), 4.96 (d, J =2.8 Hz, 1H, H-1 α), 4.27 (m, 2H, H-4 α , H-4 β), 3.94 (m, 1H, H-5 β), 3.52 (m, 1H, H-5 α), 3.47 (s, 3H, -OCH₃ β), 3.44 (s, 3H, -OCH₃ α), 2.11 (s, 6H, OAc), 1.27 (d, J =6.0 Hz, 3H, H-6 β), 1.24 (d, J =6.4 Hz, 3H, H-6 α); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 170.83 (C=OCH₃ β), 168.72 (C=OCH₃ α), 130.96 (C-3 β), 130.43 (C-3 α), 126.92 (C-2 β), 126.10 (C-2 α), 98.23 (C-1 β), 95.37 (C-1 α), 68.48 (C-5 β), 66.59 (C-4 β), 65.17 (C-5 α), 64.78 (C-4 α), 55.72 (CH₃O α), 54.65 (CH₃O β), 21.17 (COCH₃ β), 21.08 (COCH₃ α), 16.52 (C-6 β), 16.10 (C-6 α); **MS(ESI):** obliczone dla C₉H₁₄O₄: m/z 209.1 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 209.0.

etylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram11)

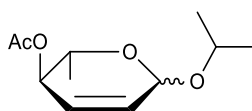
Otrzymano zgodnie z Procedurą 5. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 99.3 mg, 0.464 mmol). Otrzymano 51.1 mg **Ram11** z wydajnością 55%, w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów α : β = 5:1.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.69-5.87 (m, 2H, H-2 α , H-2 β , H-3 α , H-3 β), 4.91 (m, 2H, H-1 α , H-1 β), 3.91-3.75 (m, 2H, H-4 α , H-4 β), 3.68 (q, 1H, J =6 Hz, 12 Hz, H-5 β), 3.61-3.48 (dq, 1H, J =6.4 Hz, 12.4 Hz, H-5 α), 3.61-3.48 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 2.06 (s, 3H, OAc α), 2.05 (s, 3H, OAc β), 1.83 (d, J =8.4 Hz, 2H, CH-OH), 1.32 (d, 3H, J =6.4 Hz, H-6 β), 1.27 (d, J =6 Hz, 3H, H-6 α), 1.21 (t, 3H, J =7.2 Hz, -CH₂-CH₃); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 171.34 (C=OCH₃), 130.86 (C-3 β), 129.68 (C-3 α), 128.13 (C-2 α), 127.89 (C-2 β), 96.06 (C-1 β), 94.33 (C-1 α), 71.48 (C-5 β), 71.17 (C-5 α), 69.88 (C-4 β), 64.16 (-CH₂-CH₃), 63.51 (-CH₂-CH₃), 20.93 (COCH₃), 18.74 (C-6 β), 18.13 (C-6 α), 15.57 (-CH₂-CH₃), 15.36 (-CH₂-CH₃); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₀H₁₆O₄: m/z 201.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 201.0.

izopropilo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram12)

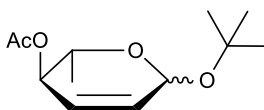
Otrzymano zgodnie z Procedurą 5. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 99.8 mg, 0.466 mmol). Otrzymano 46.9 mg **Ram12** z wydajnością 47%, w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów α : β = 10:1.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.68-5.91 (m, 2H, H-2 α , H-3 α), 5.02 (m, 1H, H-1 α), 3.96 (dt, 1H, $J=6.4$ Hz, 12.4Hz, -CH(CH₃)₂), 3.70-3.83 (m, 2H, H-5 α), 2.07 (s, 3H, OAc), 1.34 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6 β), 1.30 (d, $J=6$ Hz, H-6 α), 1.22 (d, 3H, $J=6$ Hz -CH(CH₃)₂), 1.16 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, -CH(CH₃)₂); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 171.67 (C=O), 136.05 (C-3), 129.99 (C-2), 95.44 (C-1), 73.08 (C-5), 72.53 (C-4), 70.53 (-CH(CH₃)₂), 26.55 (-CH(CH₃)₂), 24.77 (-CH(CH₃)₂), 20.37 (COCH₃), 18.63 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₁H₁₈O₄: m/z 215.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 215.2.

tert-butyl 4-O-acetyl-2,3,6-trideoxy-L-erythro-hex-2-enopyranoside (Ram13)

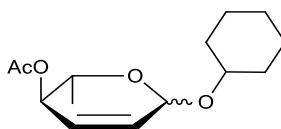
Otrzymano zgodnie z Procedurą 5. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 101.9 mg, 0.476 mmol). Otrzymano 53.2 mg **Ram13** z wydajnością 49%, w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 19:1$.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.69-5.82 (m, 2H, H-2 α , H-3 α), 5.25 (m, 1H, H-1 α), 4.99-5.03 (m, 1H, H-4 α), 4.00-4.08 (m, 2H, H-5 α , H-5 β), 2.04 (s, 3H, OAc), 1.32 (m, 10H, *t*Bu, H-6 β), 1.19 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6 α); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 170.52 (COCH₃), 129.71 (C-3), 129.07 (C-2), 89.14 (C-1), 75.12 (C-4), 71.20 (C-5), 64.56 (-C(CH₃)₃), 28.91 (-C(CH₃)₃), 21.53 (COCH₃), 18.22 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₂H₂₀O₄: m/z 229.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 229.0.

cyclohexyl 4-O-acetyl-2,3,6-trideoxy-L-erythro-hex-2-enopyranoside (Ram14)

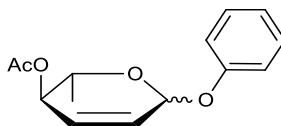
Otrzymano zgodnie z Procedurą 5. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 100.7 mg, 0.470 mmol). Otrzymano 77.7 mg **Ram14** z wydajnością 65%, w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 15:1$.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.69-5.91 (m, 2H, H-2, H-3), 5.07-5.06 (m, 1H, H-1), 3.72-3.82 (m, 2H, H-4, H-5), 3.58-3.65 (m, 1H, -CH-(CH₂-), 2.06 (s, 3H, OAc), 1.87-1.93 (m, 2H, -CH₂-), 1.72-1.76 (m, 2H, -CH₂-), 1.52-1.56 (m, 2H, -CH₂-), 1.24-1.40 (m, 2H, H-6, 2 x -CH₂-); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 170.31 (C=O), 130.74 (C-3), 128.82 (C-2), 92.79 (C-1), 76.50 (C-4), 69.80 (C-5), 68.01 (-CH=), 34.11 (-CH₂-), 32.45 (-CH₂-), 25.76 (-CH₂-), 24.62 (-CH₂-), 24.40 (-CH₂-), 20.91 (COCH₃), 18.17 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₄H₂₂O₄: m/z 255.2 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 255.5.

fenylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideokso-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram15)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 5. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 100.6 mg, 0.470 mmol). Otrzymano 56.0 mg **Ram15** z wydajnością 48%, w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 19:1$.

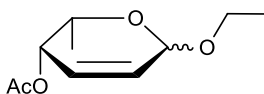


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.28-7.39 (m, 5H, -Ph), 5.66-5.82 (m, 2H, H-2, H-3), 5.03-5.06 (m, 2H, H-4), 4.93 (bs, 1H, H-1), 3.88-3.90 (m, 1H, H-5), 2.07 (s, 3H, OAc), 1.28 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6 β), 1.21 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6 α); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 171.07 (C=O), 157.17 (-Ph), 129.82 (C-3), 129.52 (-Ph), 127.89 (C-2), 123.17 (-Ph), 118.65 (-Ph), 95.54 (C-1), 71.01 (C-5), 64.92 (C-4), 55.90 (COCH₃ α), 21.20 (COCH₃), 21.09 (COCH₃), 18.12 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₄H₁₆O₄: m/z 249.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 249.1.

etylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideokso-L-treo-heks-2-enopiranozyd (Fuk11)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 14. Do reakcji użyto etylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideokso-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (**Ram11**: 45.7 mg, 0.228 mmol). Otrzymano 33.8 mg

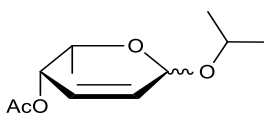
Fuk11 z wydajnością 74% (po 4 etapach), w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 6:1$.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.00-6.10 (m, 4H, H-2 α , H-2 β , H-3 α , H-3 β), 5.04 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, H-1), 4.92-4.94 (m, 1H, H-4), 4.25 (dq, 1H, $J=2.4$ Hz, 6.4 Hz, H-5), 3.79-3.87 (m, 1H, -CH_{2a}-CH₃), 3.53-3.61 (m, 1H, -CH_{2b}-CH₃), 2.11 (s, 3H, OAc α), 2.10 (s, 3H, OAc β), 1.22-1.27 (m, 9H, H-6 α , H-6 β , -CH₂-CH₃); **$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):** δ 171.01 (C=OCH_3), 170.77 (C=OCH_3), 133.10 (C-3 β), 130.69 (C-3 α), 126.77 (C-2 α), 126.00 (C-2 β), 97.49 (C-1 β), 94.13 (C-1 α), 69.51 (C-5 β), 65.22 (C-5 α), 64.63 (C-4), 64.17 (-CH₂-CH₃), 63.97 (-CH₂-CH₃), 21.08 (COCH₃ β), 20.99 (COCH₃ α), 16.53 (C-6 β), 16.17 (C-6 α), 15.44 (-CH₂-CH₃), 15.33 (-CH₂-CH₃); **MS(ESI):** obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4$: m/z 201.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 200.9.

izopropylu 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erytro-heks-2-enopiranozyd (Fuk12)

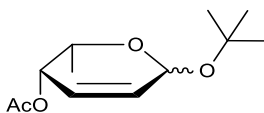
Otrzymano zgodnie z Procedurą 14. Do reakcji użyto izopropylu 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erytro-heks-2-enopiranozyd (**Ram12**: 41.8 mg, 0.195 mmol). Otrzymano 28.8 mg **Fuk12** z wydajnością 69% (po 4 etapach), w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 10:1$.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.51-6.13 (m, 2H, H-2, H-3), 5.21-5.24 (m, 1H, H-1), 5.18-5.21 (m, 1H, (-CH(CH₃)₂)), 4.61 (m, 1H, H-4), 3.87-3.92 (m, 1H, H-5), 2.09 (s, 3H, OAc α), 2.06 (s, 3H, OAc β), 1.21-1.30 (m, 12H, H-6 α , H-6 β , -CH(CH₃)₂, α -CH(CH₃)₂ β); **$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):** δ 171.12 (C=OCH_3), 170.68 (C=OCH_3), 133.02 (C-3 β), 131.09 (C-3 α), 126.29 (C-2 β), 125.94 (C-2 α), 96.79 (C-1 β), 94.82 (C-1 α), 70.5 (-CH(CH₃)₂), 69.74 (C-5 β), 67.0 (C-5 α), 64.89 (C-4 α), 64.62 (C-4 β), 23.82 (-CH(CH₃)₂), 22.27 (-CH(CH₃)₂), 21.72 (COCH₃), 16.14 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_4$: m/z 215.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 215.5.

tert-butylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-treo-heks-2-enopiranozyd (Fuk13)

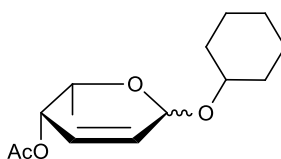
Otrzymano zgodnie z Procedurą 14. Do reakcji użyto *tert*-butylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-*erythro*-heks-2-enopiranozyd (**Ram13**: 48.6 mg, 0.213 mmol). Otrzymano 31.6 mg **Fuk13** z wydajnością 65% (po 4 etapach), w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 18:1$.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.99-6.17 (m, 2H, H-2, H-3), 5.06 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, H-1), 4.93-4.96 (m, 1H, H-4), 4.18-4.26 (m, 1H, H-5), 2.08 (s, 3H, OAc β), 2.06 (s, 3H, OAc α), 1.21-1.33 (m, 15H, H-6 α , H-6 β , $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 170.79 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 170.21 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 129.87 (C-3), 127.82 (C-2), 94.98 (C-1), 90.21 ($-\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 65.72 (C-5), 65.23 (C-4), 29.12 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 21.82 ($\text{COCH}_3\alpha$), 21.74 ($\text{COCH}_3\beta$), 16.74 (C-6 β), 16.56 (C-6 α); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4$: m/z 251.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; wyznaczone m/z 251.3.

cykloheksylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-treo-heks-2-enopiranozyd (Fuk14)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 1. Do reakcji użyto cykloheksylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-*erythro*-heks-2-enopiranozyd (**Ram14**: 69.2 mg, 0.272 mmol). Otrzymano 45.0 mg **Fuk14** z wydajnością 65% (po 4 etapach), w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 15:1$.

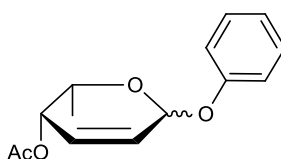


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.72-5.82 (m, 2H, H-2, H-3), 5.03-5.07 (m, 1H, H-1), 4.84-4.93 (m, 1H, H-4), 3.96 (dq, $J=6.4$ Hz, 12.4 Hz, 1H, H-5), 3.42-3.60 (m, 1H, $-\underline{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}_2)-$), 2.11 (s, 3H, OAc α), 2.09 (s, 3H, OAc β), 1.85-1.91 (m, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 1.73-1.77 (m, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 1.51-1.55 (m, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 1.21-1.43 (m, 10H, H-6 α , H-6 β , 2 x $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 171.89 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 170.58 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 130.23 (C-3), 126.63 (C-2), 95.61 (C-1), 68.74 ($-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{)$, 66.13 (C-5), 65.82 (C-4), 35.01 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 33.23 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$),

25.61 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 24.79 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 24.36 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 21.71 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 16.57 (C-6 β), 16.19 (C-6 α);
MS(ESI): obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_4$: m/z 277.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; wyznaczone m/z 277.2.

fenylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-treo-heks-2-enopiranozyd (Fuk15)

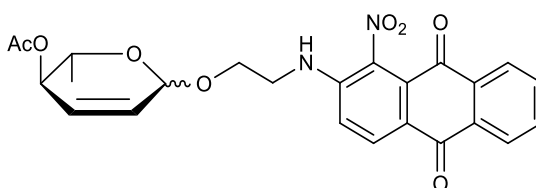
Otrzymano zgodnie z Procedurą 14. Do reakcji użyto fenylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (**Ram15**: 51.7 mg, 0.208 mmol). Otrzymano 24.3 mg **Fuk15** z wydajnością 48% (po 4 etapach), w postaci żółtawego, krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 19:1$.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.27-7.32 (m, 5H, -Ph), 5.91-6.03, (m, 2H, H-2, H-3), 5.07 (bs, 1H, H-1), 4.28-4.35 (m, 1H, H-4), 3.95-4.02 (m, 2H, H-5), 2.12 (s, 3H, OAc), 1.24 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-6 β), 1.21 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6 α); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 170.97 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 156.84 (-Ph), 130.12 (C-3), 129.73 (-Ph), 126.18 (C-2), 122.98 (-Ph), 117.84 (-Ph), 95.31 (C-1), 64.91 (C-5), 64.10 (C-4), 21.00 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 16.52 (C-6), 16.10 (C-6);
MS(ESI): obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4$: m/z 249.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 248.7.

[2-(1-nitro-antrachinono)-2-aminoetylo]-4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram16)

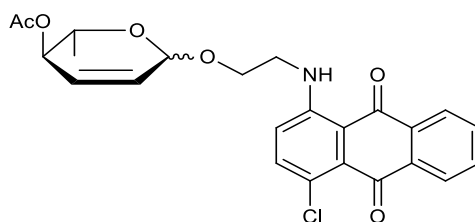
Otrzymano zgodnie z Procedurą 5. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 36.8 mg, 0.172 mmol) oraz 2-(2-hydroksyetyloamino)-1-nitroantrachinon (**Sub16**: 53.7 mg, 0.172 mmol). Otrzymano 57.7 g **Ram16** z wydajnością 72%, w postaci żółtego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 3:1$.



¹H NMR (400 MHz, CHCl₃): δ 8.08-8.10 (m, 2H, H-4(antrachinon)), 8.02-8.06 (m, 2H, -NH-), 7.79-7.83 (m, 4H, H-6(antrachinon), H-7(antrachinon)), 7.56-7.59 (m, 2H, H-3(antrachinon)), 7.06-7.08 (m, 4H, H-5(antrachinon), H-8(antrachinon)), 5.89-6.03 (m, 4H, H-2, H-3), 5.06-5.09 (m, 2H, H-4), 5.01 (d, *J*=2.0 Hz, 1H, H-1β), 4.96 (d, *J*=1.6 Hz, 1H, H-1α), 3.86-3.92 (m, 6H, -NH-CH₂-CH₂-O-, H-5), 3.74-3.76 (m, 4H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 2.09 (s, 3H, OAcα), 2.08 (s, 6H, OAcα, OAcβ), 2.06 (s, 3H, OAcβ), 1.21 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, H-6β), 1.19 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, H-6α); **¹³C NMR (100 MHz, CHCl₃):** δ 182.26 (C-9(antrachinon)), 182.12 (C-10(antrachinon)), 172.26 (C=OCH₃), 150.19 (C-2(antrachinon)), 133.50 (C-1(antrachinon)), 135.33 (C-1a(antrachinon)), 134.86 (C-4(antrachinon)), 132.20 (C-5a(antrachinon), C-8a(antrachinon)), 129.95 (C-3), 126.82 (C-6(antrachinon), C-7(antrachinon)), 126.88 (C-5(antrachinon), C-8(antrachinon)), 125.83 (C-2), 122.98 (C-4a(antrachinon)), 117.83 (C-3(antrachinon)), 102.10 (C-1), 70.89 (C-5), 70.31 (C-4), 60.11 (-NH-CH₂-CH₂-O-), 42.36 (-NH-CH₂-CH₂-O-), 20.49 (COCH₃), 17.513 (C-6b), 17.51 (C-6a); **MS(ESI):** obliczone dla C₂₄H₂₂N₂O₈: *m/z* 467.4 [M+H]⁺; wyznaczone *m/z* 467.2.

[1-(4-chloro-antrachinono)-2-aminoetylo]-4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram17)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 5. Do reakcji użyto 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 35.3 mg, 0.165 mmol) oraz 4-chloro-1-(2-hydroksyetyloamino)-antrachinon (**Sub17**: 49.8 mg, 0.165 mmol). Otrzymano 48.1 mg **Ram17** z wydajnością 64%, w postaci żółtego oleju, jako mieszaninę anomerów α:β = 3:1.

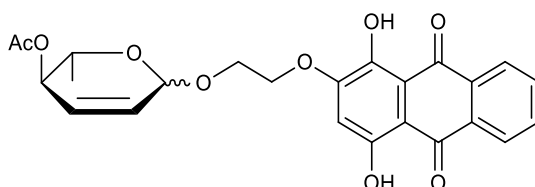


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.20-8.23 (m, 4H, H-6(antrachinon), H-7(antrachinon)), 7.97-8.01 (m, 2H, -NH-), 7.79-7.84 (m, 4H, H-5(antrachinon), H-8(antrachinon)), 7.47-7.52 (m, 2H, H-3(antrachinon)), 6.86-6.92 (m, 2H, H-2(antrachinon)), 5.89-6.09 (m, 4H, H-2, H-3), 5.02-5.07 (m, 2H, H-4), 4.99 (d, *J*=2.0 Hz, 1H, H-1β), 4.93 (d, *J*=1.6 Hz, 1H, H-1α), 3.80-3.89 (m, 6H, H-5α, H-5β, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.70-3.75 (m, 4H,

-NH-CH₂-CH₂-O-), 2.11 (s, 6H, OAc_α, OAc_β), 2.10 (s, 3H, OAc_α), 2.08 (s, 3H, OAc_β), 1.21 (d, *J*=6.0 Hz, 3H, H-6_β), 1.18 (d, *J*=6.0 Hz, 3H, H-6_α); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 187.21 (C-9(antrachinon)), 185.17 (C-10(antrachinon)), 171.24 (C=O), 143.57 (C-1(antrachinon)), 134.26 (C-5a(antrachinon), C-8a(antrachinon)), 132.21 (C-6(antrachinon), C-7(antrachinon)), 131.29 (C-3(antrachinon)), 129.20 (C-3), 127.49 (C-2), 125.85 (C-5(antrachinon), C-8(antrachinon)), 122.92 (C-4(antrachinon)), 118.87 (C-2(antrachinon)), 113.36 (C-1a(antrachinon)), 108.39 (C-1), 78.24 (C-4), 71.22 (C-5), 63.19 (-NH-CH₂-CH₂-O-), 45.32 (-NH-CH₂-CH₂-O-), 21.49 (COCH₃), 17.23 (C-6_β), 17.20 (C-6_α); MS(ESI): obliczone dla C₂₄H₂₂ClNO₆: m/z 456.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 456.1.

[2-(1,4-dihydroksyantrachinono)-2-etoksy]-4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erytro-heks-2-enopiranozyd (Ram18)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 5. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 35.7 mg, 0.167 mmol) oraz 1,4-dihydroksy-2-(3-hydroksyetoksy)antrachinon (**Sub5**: 50.1 mg, 0.167 mmol). Otrzymano 28.8 mg **Ram18** z wydajnością 38%, w postaci bezpostaciowego czerwonego ciała stałego, jako mieszaninę anomerów α:β = 3:1.

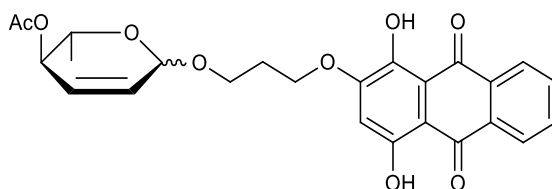


¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.33 (m, 2H, (C-1 antrachinon)-OH), 13.06 (s, 2H, (C-4 antrachinon)-OH), 8.14 (m, 4H, H-7(antrachinon), H-8(antrachinon)), 7.88 (m, 4H, H-5(antrachinon), H-6(antrachinon)), 6.90 (s, 2H, H-3(antrachinon)), 5.62 (m, 4H, H-2, H-3), 5.10 (m, 2H, H-4), 4.87 (d, 1H, *J*=2.0 Hz, H-1), 4.86 (d, 1H, *J*=2.0 Hz, H-1), 4.15 (m, 4H, cukier-O-CH₂-CH₂-O-Ph), 3.70 (m, 4H, cukier-O-CH₂-CH₂-O-Ph), 3.65 (m, 1H, H-5) 2.20 (s, 3H, OAc), 2.19 (s, 3H, OAc), 1.19 (d, 3H, *J*=8.0 Hz, H-6_β), 1.18 (d, 3H, *J*=8.0 Hz, H-6_α); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 186.97 (C-9(antrachinon)), 185.93 (C-10(antrachinon)), 170.48 (C=O), 156.34 (C-4(antrachinon)), 153.23 (C-2(antrachinon)), 143.68 (C-1(antrachinon)), 133.60 (C-5a(antrachinon), C-8a(antrachinon)), 132.59 (C-6(antrachinon), C-7(antrachinon)), 129.45 (C-4), 127.25 (C-3), 126.54 (C-5(antrachinon), C-8(antrachinon)), 116.10 (C-1a(antrachinon)), 106.32

(C-4a(antrachinon)), 104.85 (C-3(antrachinon)), 98.20 (C-1), 69.89 (cukier-O-CH₂-CH₂-O-Ph), 60.92 (cukier-O-CH₂-CH₂-O-Ph), 21.47 (COCH₃) 17.24 (C-6), 17.11 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₂₄H₂₂O₉: m/z 455.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 454.6.

[2-(1,4-dihydroksyantrachinono)-3-propoksy]-4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram19)

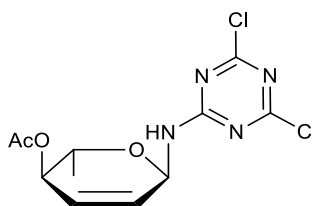
Otrzymano zgodnie z Procedurą 5. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 35.8 mg, 0.167 mmol) oraz 1,4-dihydroksy-2-(3-hydroksypropyloksy)anthrachinon (**Sub6**: 52.5 mg, 0.167 mmol). Otrzymano 19.6 mg **Ram19** z wydajnością 25%, w postaci czerwonego osadu, jako mieszaninę anomerów α:β = 3:1; **T.t.** = 143 – 145 °C.



¹H NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.48 (m, 2H, 1-OH), 13.20 (s, 2H, 4-OH), 8.42 (m, 4H, H-7(antrachinon), H-8(antrachinon)), 7.91 (m, 4H, H-5(antrachinon), H-6(antrachinon)), 6.71 (s, 2H, H-3(antrachinon)), 5.48-5.53 (m, 4H, H-2, H-3), 5.14 (m, 2H, H-4), 4.94 (d, 1H, *J*=2.0 Hz, H-1), 4.93 (d, 1H, *J*=2.0 Hz, H-1), 4.50 (m, 2H, cukier-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-Ph), 3.72 (m, 1H, H-5), 3.48 (m, 2H, cukier-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-Ph), 2.30 (m, 2H, cukier-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-Ph), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.15 (s, 3H, OAc), 1.14 (d, 3H, *J*=8.0 Hz, H-6β), 1.13 (d, 3H, *J*=8.0 Hz, H-6α); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 186.42 (C-9(antrachinon)), 183.61 (C-10(antrachinon)), 169.56 (COCH₃), 160.23 (C-4(antrachinon)), 156.98 (C-2(antrachinon)), 149.79 (C-1(antrachinon)), 134.24 (C-5a(antrachinon), C-8a(antrachinon)), 132.60 (C-6(antrachinon), C-7(antrachinon)), 130.26 (C-4), 129.42 (C-3), 128.56 (C-5(antrachinon), C-8(antrachinon)), 110.21 (C-1a(antrachinon)), 109.88 (C-3(antrachinon)), 106.20 (C-4a(antrachinon)), 99.22 (C-1), 68.36 (cukier-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-Ph), 57.19 (cukier-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-Ph), 31.20 (cukier-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-Ph), 20.52 (COCH₃), 18.25 (C-6), 18.12 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₂₅H₂₄O₉: m/z 469.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 468.8.

4-O-acetylo-1,2,3,6-tetradeoeksy-N-(2,4-dichloro-1,3,5-triazyn-6-ylo)- α -L-erythro-heks-2-enopiranozyloamina (Ram20)

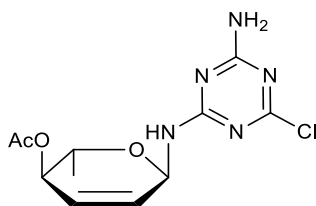
Otrzymano zgodnie z Procedurą 4 z 3,4-di-O-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**: 130.5 mg, 0.609 mmol) rozpuszczonego w CH₂Cl₂ (5 mL), **Sub19** (100.5 mg, 0.609 mmol) oraz jodu (154.6 mg, 0.609 mmol). Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie rozpuszczalników *n*-heksan:AcOEt (8:1, v/v). Otrzymano 133.8 mg **Ram20** z wydajnością 53%, w postaci oleju, jako anomer α . $\alpha^{24}_D = -33.7$ (c = 0.25, CHCl₃).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.38 (bs, 2H, NH), 5.87-6.12 (m, 4H, H-1, H-3), 5.81-5.85 (m, 2H, H-2), 4.95-5.05 (m, 2H, H-4), 3.95 (m, 1H, H-5), 3.80 (dq, $J=6.0$ Hz, 6.4 Hz, 14.4 Hz, 1H, H-5), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 1.26 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-6 β), 1.24 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-6 α); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 171.27 (COCH₃), 170.93 (COCH₃), 170.89 (C-4(triazyna)), 170.88 (C-6(triazyna)), 166.04 (C-2(triazyna)), 131.39 (C-2), 126.56 (C-3), 76.83 (C-1), 72.36 (C-5), 69.86 (C-4), 21.10 (COCH₃), 18.19 (C-6) 18.11 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₁H₁₂Cl₂N₄O₃: m/z 341.0 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 341.2.

4-O-acetylo-1,2,3,6-tetradeoeksy-N-(2-amino-4-chloro-1,3,5-triazyn-6-ylo)- α -L-erythro-heks-2-enopiranozyloamina (Ram21)

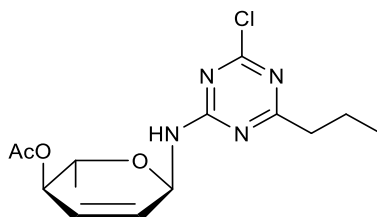
Otrzymano zgodnie z Procedurą 4 z 3,4-di-O-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**: 150.1 mg, 0.703 mmol) rozpuszczonego w CH₂Cl₂ (5 mL), **Sub20** (102.3 mg, 0.703 mmol) oraz jodu (178.4 mg, 0.703 mmol). Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie rozpuszczalników *n*-heksan:AcOEt (8:1, v/v). Otrzymano 100.8 mg **Ram21** z wydajnością 48%, w postaci oleju, jako anomer α . $\alpha^{24}_D = 17.3$ (c = 0.25, CHCl₃).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.60 (bs, 2H, -NH₂), 6.15 (bs, 1H, -NH-), 6.09-5.94 (m, 5H, H-2, H-3, H-1), 5.82 (m, 1H, H-2), 5.73 (bs, 1H, H-1), 4.84-5.06 (m, 2H, H-4), 3.88-3.97 (m, 2H, H-5), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 1.26 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, H-6β), 1.23 (d, *J*=6.0 Hz, 3H, H-6α); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 170.66 (C=O), 170.09 (C=O), 170.01 (C-6(triazyna)), 166.78 (C-4(triazyna)), 165.27 (C-2(triazyna)), 130.00 (C-3), 126.85 (C-2), 82.63 (C-1), 72.81 (C-4), 69.55 (C-5), 20.53 (COCH₃), 17.62 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₁H₁₄ClN₅O₃: *m/z* 300.1 [M+H]⁺; wyznaczone *m/z* 300.2.

4-O-acetylo-1,2,3,6-tetraeoxy-N-(2-chloro-4-propylo-1,3,5-triazyn-6-yl)-α-L-erythro-heks-2-enopiranozyloamina (Ram22)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 4 z 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**: 73.4 mg, 0.343 mmol) rozpuszczonego w CH₂Cl₂ (5 mL), **Sub27** (59.2 mg, 0.343 mmol) oraz jodu (87.1 mg, 0.343 mmol). Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie rozpuszczalników *n*-heksan:AcOEt (4.5:1, v/v). Otrzymano 57.1 mg **Ram22** z wydajnością 51%, w postaci żółtawego syropu, jako anomer α. α²⁴_D = -24.8 (*c* = 0.25, CHCl₃).

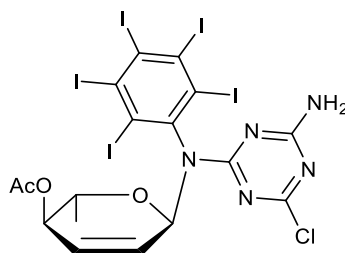


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.87 (bs, 1H, -NH-), 5.96 (dd, *J*=1.6 Hz, 10.0 Hz, 1H, H-3), 5.90 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, H-2), 5.81 (m, 1H, H-4), 4.67 (m, 1H, H-1), 3.84 (dq, *J*=6.4 Hz, 6.8 Hz, 12.0Hz, 1H, H-5), 2.14 (s, 3H, OAc), 1.21 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, H-6); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 171.32 (C=O), 170.61 (C-4(triazyna)), 170.26 (C-6(triazyna)), 169.08 (-Ph), 168.34 (C-2(triazyna)), 131.29 (C-3), 124.46 (C-2), 119.33 (-Ph), 110.20 (-Ph), 91.10 (C-1), 90.78

(-Ph), 74.73 (C-5), 69.76 (C-4), 20.82 (COCH₃), 17.16 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₇H₁₉ClI₅N₅O₃: m/z 1011.6 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 1011.3.

4-O-acetylo-1,2,3,6-tetradeksoxy-N-(2,4-dichloro-1,3,5-triazyn-6-ylo)-N-(2,3,4,5,6-pentajodo-fenilo)-α-L-erythro-heks-2-enopiranozyloamina (Ram23)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 4 z 3,4-di-O-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**: 90.4 mg, 0.422 mmol) rozpuszczonego w CH₂Cl₂ (5 mL), **Sub21** (101.8 mg, 0.422 mmol) oraz jodu (107.1 mg, 0.422 mmol). Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie rozpuszczalników *n*-heksan:AcOEt (4.5:1, v/v). Otrzymano 198.9 mg **Ram23** z wydajnością 46%, w postaci żółtawego syropu, jako anomer α. α²⁴_D = -39.1 (c = 0.25, CHCl₃).



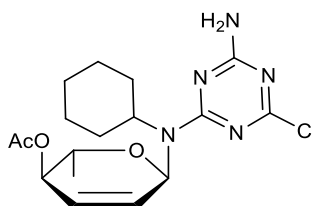
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.96 (dd, *J*=1.6 Hz, 10.0 Hz, 1H, H-3), 5.90 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, H-2), 5.81 (m, 1H, H-4), 4.67 (m, 1H, H-1), 3.84 (dq, *J*=6.4 Hz, 6.8 Hz, 12.0Hz, 1H, H-5), 2.14 (s, 3H, OAc), 1.21 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 171.32 (COCH₃), 170.61 (C-6(triazyna)), 170.26 (C-4(triazyna)), 169.08 (-Ph), 168.34 (C-2(triazyna)), 131.29 (C-3), 124.46 (C-2), 119.33 (-Ph), 110.20 (-Ph), 91.10 (C-1), 90.78 (-Ph), 74.73 (C-5), 69.76 (C-4), 20.82 (COCH₃), 17.16 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₇H₁₉ClI₅N₅O₃: m/z 1011.6 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 1011.3.

4-O-acetylo-1,2,3,6-tetradeksoxy-N-cykloheksylo-N-(2,4-dichloro-1,3,5-triazyn-6-ylo)-α-L-erythro-heks-2-enopiranozyloamina (Ram24)

Metuda 1: Otrzymano zgodnie z Procedurą 4 z 3,4-di-O-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**: 91.0 mg, 0.425 mmol) rozpuszczonego w CH₂Cl₂ (5 mL), **Sub22** (105.1 mg, 0.425 mmol) oraz jodu (107.9 mg, 0.425 mmol). Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie rozpuszczalników *n*-heksan:AcOEt (4.5:1, v/v).

Otrzymano 75.0 mg **Ram24** z wydajnością 44%, w postaci żółtawego syropu jako anomer α . $\alpha^{24}_{\text{D}} = -55.0$ ($c = 0.25$, CHCl_3).

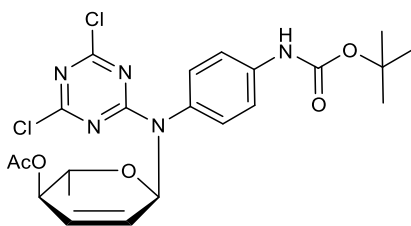
Metoda 2: Otrzymano zgodnie z Procedurą 12 z 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**: 89.5 mg, 0.418 mmol) rozpuszczonego w CH_2Cl_2 (5 mL), **Sub22** (103.4 mg, 0.418 mmol) oraz jodu (106.1 mg, 0.418 mmol). Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym, w temperaturze -10 °C. Po 24 godz. analiza TLC nie wykazała pojawiania się produktu, w związku z czym reakcję zakończono.



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.90 (m, 1H, H-3), 5.86 (m, 1H, H-2), 5.48 (m, 1H, H-1), 3.95(m, 1H, H-4), 3.86 (m, 1H, CH), 3.61 (m, 1H, H-5), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.00 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.75 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.64 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.33 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.26 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.25 (d, $J=6.0$ Hz, 3H, H-6); **^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3):** δ 175.74 (C-2(triazyna)), 170.17 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 169.93 (C-6(triazyna)), 167.23 (C-4(triazyna)), 130.89 (C-2), 129.12 (C-3), 102.48 (C-1), 72.78 (C-5), 69.33 (C-4), 57.69 (C-1(cykloheksan)), 30.35 ($-\text{CH}_2-$), 31.20 ($-\text{CH}_2-$), 26.73 ($-\text{CH}_2-$), 25.65 ($-\text{CH}_2-$), 24.82 ($-\text{CH}_2-$), 21.17 (COCH_3), 16.14 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{O}_3$: m/z 382.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 382.0.

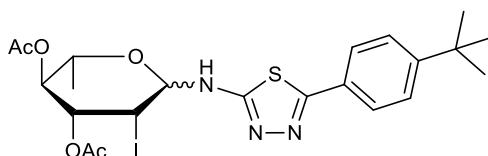
4-*O*-acetylo-1,2,3,6-tetraeoxy-*N*-(4-*N*-Boc-fenylamino)-*N*-(2,4-dichloro-1,3,5-triazyn-6-yl)- α -L-erythro-heks-2-enopyranosyloamina (Ram25)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 4 z 3,4-di-*O*-acetylo-L-ramnalu (**Ram3**: 90.4 mg, 0.422 mmol) rozpuszczonego w CH_2Cl_2 (5 mL), **Sub25** (101.8 mg, 0.422 mmol) oraz jodu (107.1 mg, 0.422 mmol). Analiza TLC wykazała obecność skomplikowanej mieszaniny produktów, której zdecydowano się nie rozdzielać.



3,4-di-O-acetylo-1,2-dideoxy-2-jodo-N-[5-(4-tert-butylfenylo)-1,3,4-tiadiazol-3-ylo]-L-ramnopiranozyloamina (Ram26)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 17. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 80 mg, 0.383 mmol) oraz 2-amino-5-(4-tert-butylfenylo)-1,3,4-tiadiazol (**Sub36**: 174 mg, 0.746 mmol). Otrzymano 62.9 mg **Ram26** z wydajnością 71%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 11:1$.

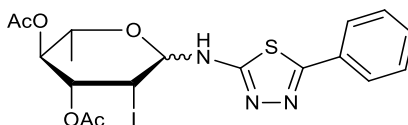


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.58-7.56 (m, 4H, -Ph), 7.46-7.43 (m, 4H, -Ph), 6.04 (d, $J=4.6$ Hz, 1H, H-1 α), 5.90 (d, $J=10.4$ Hz, 1H, H-1 β), 5.44 (dd, $J=9.2$ Hz, 11.2 Hz, 1H, H-4 α), 4.87 (t, $J=9.6$ Hz, 1H, H-3 α), 4.69-4.62 (m, 1H, H-2 α), 3.87 (dq, $J=6$ Hz, 10 Hz, 1H, H-5 α), 2.12 (s, 3H, COCH_3), 2.08 (s, 3H, COCH_3), 2.06 (s, 3H, COCH_3), 2.05 (s, 3H, COCH_3), 1.34 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.26 (d, $J=6$ Hz, 1H, $\text{CH}_3\alpha$), 1.19 (d, 1H, $J=6.4$ Hz, $\text{CH}_3\beta$); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 170.05 ($\text{C}=\text{O}$), 169.72 ($\text{C}=\text{O}$), 167.26 ($-\text{S}=\text{C}=\text{N}$), 154.48 ($-\text{N}=\text{C}=\text{N}$), 127.43 (-Ph), 126.29 (-Ph), 126.02 (-Ph), 81.64 (C-1), 76.35 (C-3), 74.08 (C-5), 72.72 (C-4), 35.18 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.35 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.86 (C-2), 21.05 (COCH_3), 20.91 (COCH_3), 17.52 (C-6); **HRMS** obliczone dla $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{IN}_3\text{O}_5\text{S}$: m/z 574.0867 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 574.0874.

3,4-di-O-acetylo-1,2-dideoxy-2-jodo-N-(5-fenylo-1,3,4-tiadiazol-3-ylo)-L-ramnopiranozyloamina (Ram27)

Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 220 mg, 1.027 mmol) i 2-amino-5-fenylo-1,3,4-tiadiazol (**Sub37**: 364 mg, 2.054 mmol).

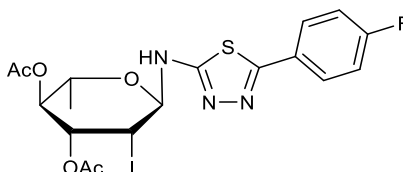
Otrzymano 85.8 mg **Ram27** z wydajnością 47%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1.7:1$.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 7.70-7.68 (m, 2H, -Ph), 7.65-7.63 (m, 3H, -Ph), 6.28 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, H-1 α), 5.91 (d, $J=10.2$ Hz, 1H, H-1 β), 5.44 (dd, $J=9.0$ Hz, 10.8 Hz, 1H, H-4 β), 5.32 (dd, $J=3.6$ Hz, 6Hz, 1H, H-3 α), 5.10 (t, $J=4.8$ Hz, 1H, H-2 α), 5.04 (t, $J=6.6$ Hz, 1H, H-4 α), 4.88 (t, $J=9.6$ Hz, 1H, H-3 β), 4.69-4.62 (m, 1H, H-2 β), 4.15-4.11 (m, 1H, 5 α), 3.88 (dq, $J=6.6$ Hz, 9.6 Hz, 1H, H-5 β), 2.18 (s, 3H, COCH_3), 2.12 (s, 3H, COCH_3), 2.11 (s, 3H, COCH_3), 2.06 (s, 3H, COCH_3), 1.38 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_3\alpha$), 1.28 (d, $J=6$ Hz, 1H, $\text{CH}_3\beta$); **$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):** δ 170.07 ($\text{C}=\text{O}$), 169.83 ($\text{C}=\text{O}$), 169.71 ($\text{C}=\text{O}$), 162.12 (-S-C=N), 147.46 (-N-C=N), 130.89 (-Ph), 130.20 (-Ph), 129.16 (-Ph), 129.03 (-Ph), 128.35 (-Ph), 126.42 (-Ph), 126.41 (-Ph), 76.83 (C-1), 74.04 (C-3), 72.89 (C-2), 72.07 (C-5), 71.33 (C-4), 26.89 (C-2), 21.26 (COCH_3), 21.17 (COCH_3), 21.09 (COCH_3), 20.82 (COCH_3), 17.54 (C-6), 17.16 (C-6); **HRMS** obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{IN}_3\text{O}_5\text{S}$: m/z 518.0241 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; wyznaczone m/z 518.0251.

3,4-di-O-acetylo-1,2-dideoksy-2-jodo-N-[5-(4-fluorofenylo)-1,3,4-tiadiazol-3-ylo]- β -L-ramnopiranozyloamina (Ram28)

Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 137 mg, 0.640 mmol) i 2-amino-5-(4-fluorofenylo)-1,3,4-thiadiazol (**Sub38**: 250 mg, 1.281 mmol). Otrzymano 68.7 mg **Ram28** z wydajnością 55%, w postaci żółtawego oleju jako anomer α ; $\alpha^{24}_{\text{D}} = -80$ ($c = 0.25$, CHCl_3).

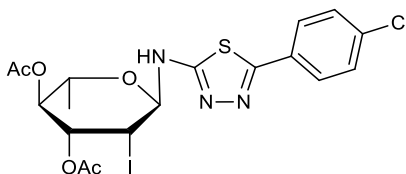


$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 7.65-7.62 (m, 2H, -Ph), 7.14-7.11 (m, 2H, -Ph), 5.90 (d, 1H, $J=9.6$ Hz, H-1 β), 5.44 (dd, 1H, $J=9.6$ Hz, 10.8 Hz, H-4 β), 4.87 (dd, 1H, $J=9.6$ Hz, H-3 β),

4.67-4.60 (m, 1H, H-2 β) 3.89-3.85 (m, 1H, H-5 β), 2.12 (s, 3H, COCH₃), 2.06 (s, 3H, COCH₃), 1.28 (d, 3H, $J=6$ Hz, CH₃ β); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 170.08 (C=O), 169.71 (C=O), 166.73 (-S-C=N), 164.26 (d, $J=251.0$ Hz, C-F), 154.82 (-N-C=N), 132.47 (-Ph), 128.43 (-Ph), 128.35 (-Ph), 116.37 (-Ph), 116.23 (-Ph), 83.87 (C-1), 76.39 (C-3), 74.04 (C-4), 72.82 (C-5), 27.07 (C-2), 21.03 (COCH₃), 20.92 (COCH₃), 17.51 (C-6); HRMS obliczone dla C₁₈H₁₉FIN₃O₅S: m/z 536.0147 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 536.0153.

3,4-di-O-acetylo-1,2-dideoksy-2-jodo-N-[5-(4-chlorofenylo)-1,3,4-tiadiazol-3-ylo]- β -L-ramnopiranozyloamina (Ram29)

Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 121 mg, 0.565 mmol) i 2-amino-5-(4-chlorofenylo)-1,3,4-tiadiazol (**Sub39**: 239 mg, 1.129 mmol). Otrzymano 58.6 mg **Ram29** z wydajnością 49%, w postaci żółtawego oleju jako anomer α ; $\alpha^{24}_D = -13.3$ (c = 0.45, CHCl₃).

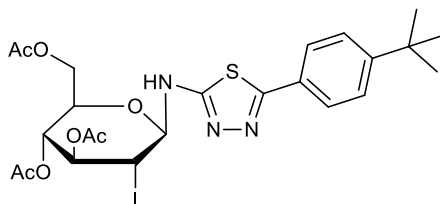


¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.58-7.56 (m, 2H, -Ph), 7.42-7.40 (m, 2H, -Ph), 5.91 (d, 1H, $J=9.6$ Hz, H-1 β), 5.44 (dd, 1H, $J=9.6$ Hz, 11.4 Hz, H-4 β), 4.87 (t, 1H, $J=9.6$ Hz, H-3 β), 4.65-4.59 (m, 1H, H-2 β) 3.89-3.85 (m, 1H, H-5 β), 2.12 (s, 3H, COCH₃), 2.06 (s, 3H, COCH₃), 1.28 (d, 3H, $J=6$ Hz, CH₃ β); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 170.09 (C=O), 169.76 (C=O), 165.83 (-S-C=N), 146.36 (-N-C=N), 136.91 (C-Cl), 136.42 (-Ph), 129.36 (-Ph), 127.68 (-Ph), 83.81 (C-1), 76.25 (C-3), 74.09 (C-4), 72.80 (C-5), 42.73 (C-2), 21.06 (COCH₃), 20.93 (COCH₃), 17.56 (C-6); HRMS obliczone dla C₁₈H₁₉ClIN₃O₅S: m/z 551.9851 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 551.9855.

3,4,6-tri-O-acetylo-1,2-dideoksy-2-jodo-N-[5-(4-tert-butylofenylo)-1,3,4-tiadiazol-3-ylo]- β -D-glukopiranozyloamina (Glu7)

Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4,6-tri-O-acetylo-D-glukal (**Glu3**: 360 mg, 1.322 mmol) i 2-amino-5-(4-tert-butylofenylo)-1,3,4-tiadiazol (**Sub36**: 617 mg,

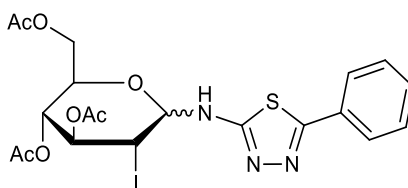
2.644 mmol). Otrzymano 157.7 mg **Glu7** z wydajnością 51%, w postaci żółtawego oleju, jako anomer β ; $\alpha^{24}_D = 8.6$ ($c = 0.35$, CHCl_3).



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.60-7.43 (m, 4H, -Ph), 6.01 (d, $J=10.4$ Hz, 1H, H-1 β), 5.51 (dd, $J=8.8$ Hz, 10.8 Hz, 1H, H-4 β), 5.14 (dd, $J=9.6$ Hz, 10 Hz, 1H, H-3 β), 4.73-4.68 (m, 1H, H-2 β), 4.35 (dd, $J=4.4$ Hz, 12.8 Hz, 1H, H-6 β), 4.15 (dd, $J=2.0$ Hz, 12.4 Hz, 1H, H-6 β), 4.10-4.06 (m, 1H, H-5 β), 2.12 (s, 3H, COCH_3), 2.06 (s, 3H, COCH_3), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 1.35 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.34 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.33 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ 170.53 (COCH_3), 170.41 (COCH_3), 170.19 (COCH_3), 169.82 (COCH_3), 165.54 (-S-C=N), 156.23 ($\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 154.41 ($\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 146.23 (-S-C=N), 129.38 (-Ph), 128.15 (-Ph), 127.03 (-Ph), 126.85 (-Ph), 98.60 (C-1), 80.29 (C-1), 74.28 (C-3), 73.27 (C-3), 70.53 (C-5), 68.21 (C-5), 63.54 (C-4), 63.26 (C-4), 62.25 (C-6), 60.80 (C-6), 36.17 (C-2), 31.52 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.64 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.36 (C-2), 21.91 (COCH_3), 21.54 (COCH_3), 20.96 (COCH_3), 20.72 (COCH_3), 20.5 (COCH_3); **HRMS** obliczone dla $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: m/z 632.0922 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; wyznaczone m/z 632.0930.

3,4,6-tri-O-acetylo-1,2-dideoksy-2-jodo-N-(5-fenyl-1,3,4-tiadiazol-3-yl)-D-glukopiranozyloamina (Glu8)

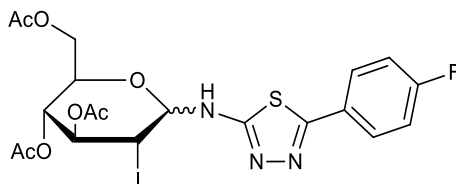
Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4,6-tri-O-acetylo-D-glukal (**Glu3**: 243 mg, 0.893 mmol) i 2-amino-5-fenyl-1,3,4-tiadiazol (**Sub37**: 316 mg, 1.783 mmol). Otrzymano 107.8 mg **Glu8** z wydajnością 68%, w postaci żółtawego oleju jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:4.4$.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.70-7.68 (m, 2H, -Ph), 7.47-7.44 (m, 3H, -Ph), 6.30 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, H-1β), 5.94 (d, *J*=10.8 Hz, 1H, H-1α), 5.48 (dd, *J*=9.6 Hz, 11.4 Hz, 1H, H-3α), 5.36 (dd, 1H, *J*=4.2 Hz, 6.6 Hz, H-3β), 5.28 (t, *J*=6.6 Hz, 1H, H-4β), 5.15-5.10 (m, 2H, H-4α, H-6β), 4.72-4.67 (m, 1H, H-6α), 4.37-4.34 (m, 2H, H-2α, H-6β), 4.29-4.22 (m, 2H, H-2β, H-5β), 4.14 (dd, *J*=1.8 Hz, 12.6 Hz 1H, H-6α), 4.00 (m, 1H, H-5α), 2.19 (s, 3H, COCH₃), 2.12 (s, 6H, COCH₃), 2.09 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 2.05 (s, 3H, COCH₃); **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ 170.72 (C=O), 169.57 (C=O), 169.38 (C=O), 161.53 (-S-C=N), 147.57 (-N-C=N), 130.82 (-Ph), 129.07 (-Ph), 126.23 (-Ph), 82.90 (C-1), 72.93 (C-3), 70.81 (C-5), 67.52 (C-4), 61.64 (C-6), 25.72 (C-2), 21.06 (COCH₃), 20.80 (COCH₃), 20.72 (COCH₃); **HRMS** obliczone dla C₂₀H₂₂N₃O₇S: *m/z* 576.0296 [M+H]⁺; wyznaczone *m/z* 576.0309.

3,4,6-tri-*O*-acetylo-1,2-dideoksy-2-jodo-*N*-[5-(4-fluorofenylo)-1,3,4-tiadiazol-3-ylo]-*D*-glukopiranozyloamina (Glu9)

Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4,6-tri-*O*-acetylo-*D*-glukal (**Glu3**: 304 mg, 1.117 mmol) i 2-amino-5-(4-fluorofenylo)-1,3,4-tiadiazol (**Sub38**: 436 mg, 2.233 mmol). Otrzymano 126.4 mg **Glu9** z wydajnością 58%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów α:β = 1:1.3.

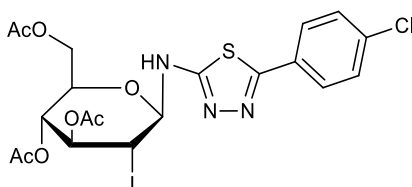


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.15-8.10 (m, 2H, -Ph), 7.16-7.12 (m, 2H, -Ph), 6.27 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, H-1α), 5.99 (d, *J*=10.4 Hz, 1H, H-1β), 5.50 (dd, *J*=9.2 Hz, 11.2 Hz, 1H, H-3β), 5.33-5.30 (m, 1H, H-3α), 5.26 (t, *J*=6.8 Hz, 1H, H-4α), 5.16-5.11 (m, 2H, H-4β, H-2α), 4.71-4.66 (m, 1H, H-2β), 4.44-4.21 (m, 4H, H-5α, H-6aα, H-6bα, H-6aβ), 4.14 (dd, *J*=2.0 Hz, 14.4 Hz 1H, H-6bβ), 4.07-4.03 (m, 1H, H-5β), 2.19 (s, 3H, COCH₃), 2.12 (s, 3H, COCH₃), 2.10 (s, 3H, COCH₃), 2.05 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 3H, COCH₃); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 170.62 (C=O), 170.06 (C=O), 169.65 (C=O), 169.52 (C=O), 169.34 (C=O), 166.28 (d, *J*=153.0 Hz, C-F), 163.09 (-S-C=N), 145.64 (-N-C=N), 132.87 (-Ph), 132.75 (-Ph), 129.02 (-Ph), 128.21 (-Ph), 116.34 (-Ph), 116.17 (-Ph), 115.85 (-Ph), 115.56 (-Ph), 84.22 (C-1), 83.57 (C-1), 76.13 (C-3), 74.39 (C-3), 73.27 (C-5), 70.61 (C-5), 68.79

(C-4), 67.31 (C-4), 61.84 (C-6), 61.57 (C-6), 25.93 (C-2), 25.48 (C-2), 21.43 (COCH₃), 21.09 (COCH₃), 20.82 (COCH₃), 20.76 (COCH₃), 20.60 (COCH₃); **HRMS** obliczone dla C₂₀H₂₁FIN₃O₇S: m/z 594.0202 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 509.0209.

3,4,6-tri-O-acetylo-1,2-dideoksy-2-jodo-N-[5-(4-chlorofenylo)-1,3,4-tiadiazol-3-ylo]-β-D-glukopiranozyloamina (Glu10)

Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4,6-tri-O-acetylo-D-glukal (**Glu3**: 288 mg, 1.058 mmol) i 2-amino-5-(4-chlorofenylo)-1,3,4-tiadiazol (**Sub39**: 448 mg, 2.116 mmol). Otrzymano 154.6 mg **Glu10** z wydajnością 69%, w postaci żółtawego oleju, jako anomer β; α²⁴_D = 177.7 (c = 0.6, CHCl₃).

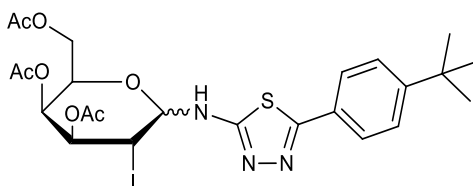


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.59-7.56 (m, 2H, -Ph), 7.43-7.40 (m, 2H, -Ph), 5.94 (d, J=10.0 Hz, 1H, H-1β), 5.47 (dd, J=8.8 Hz, 10.8 Hz, 1H, H-3β), 5.13 (dd, J=9.2 Hz, 10 Hz, 1H, H-4β), 4.68-4.62 (m, 1H, H-2β), 4.35 (dd, J=4.4 Hz, 12.4 Hz, 1H, H-6aβ), 4.14 (dd, J=2.4 Hz, 12.8 Hz 1H, H-6bβ), 4.01-3.97 (m, 1H, H-5β), 2.12 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 3H, COCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 170.62 (COCH₃), 170.51 (COCH₃), 169.84 (COCH₃), 169.72 (COCH₃), 169.58 (COCH₃), 156.64 (-S-C=N), 146.59 (-N-C=N), 139.30 (C-Cl), 129.81 (-Ph), 129.67 (-Ph), 129.14 (-Ph), 128.36 (-Ph), 127.92 (-Ph), 98.74 (C-1), 80.90 (C-1), 78.27 (C-3), 73.51 (C-3), 68.27 (C-5), 67.54 (C-5), 64.32 (C-4), 62.50 (C-6), 60.59 (C-6), 29.87 (C-2), 26.76 (C-2), 21.52 (COCH₃), 21.31 (COCH₃), 20.94 (COCH₃), 20.78 (COCH₃), 20.67 (COCH₃); **HRMS** obliczone dla C₂₀H₂₁ClIN₃O₇S: m/z 609.9906 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 609.9917.

3,4,6-tri-O-acetylo-1,2-dideoxy-2-jodo-N-[5-(4-tert-butylofenylo)-1,3,4-tiadiazol-3-ylo]-D-galaktopiranozyloamina (Gal4)

Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4,6-tri-O-acetylo-D-galaktal (**Gal3**: 163 mg, 0.599 mmol) i 2-amino-5-(4-tert-butylofenylo)-1,3,4-tiadiazol (**Sub36**: 279 mg,

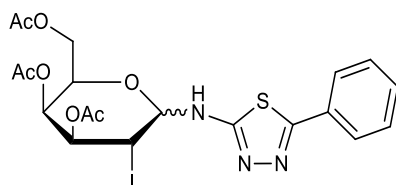
1.196 mmol). Otrzymano 100.7 mg **Gal4** z wydajnością 72%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 2.3:1$.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 7.80-7.62 (m, 2H, -Ph), 7.50-7.46 (m, 2H, -Ph), 6.72 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-1 α), 6.55 (dd, 1H, $J=1.2$ Hz, 6.0 Hz, H-1 β), 5.80 (t, 1H, $J=3.0$ Hz, H-4 β), 5.55-5.53 (m, 1H, H-4 α), 5.49 (dd, 1H, $J=3.6$ Hz, 5.4 Hz, H-3 α), 5.42-5.41 (m, 1H, H-3 β), 5.09 (dd, 1H, $J=3.6$ Hz, 8.4 Hz, H-2 α), 4.72-4.71 (m, 1H, H-2 β), 4.54-4.51 (m, 1H, H-5 α), 4.49-4.47 (m, 1H, H-5 β), 4.32-4.30 (m, 1H, H-6 α), 4.27-4.19 (m, 3H, H-6 α , H-6 β), 2.33 (s, 6H, $\text{COCH}_3\alpha$, $\text{COCH}_3\beta$), 2.26 (s, 6H, $\text{COCH}_3\alpha$, $\text{COCH}_3\beta$), 2.12 (s, 6H, $\text{COCH}_3\alpha$, $\text{COCH}_3\beta$), 2.07 (s, 3H, $\text{COCH}_3\alpha$), 2.02 (s, 3H, $\text{COCH}_3\beta$), 1.34 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.33 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); **$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):** δ 170.69 ($\text{C}=\text{O}$), 170.33 ($\text{C}=\text{O}$), 170.21 ($\text{C}=\text{O}$), 169.53 ($\text{C}=\text{O}$), 165.72 (-S-C=N), 156.47 ($\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 155.26 ($\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 145.54 (-S-C=N), 129.13 (-Ph), 128.38 (-Ph), 126.78 (-Ph), 126.34 (-Ph), 98.98 (C-1), 81.54 (C-1), 73.03 (C-3), 72.97 (C-3), 69.41 (C-5), 66.22 (C-5), 64.08 (C-4), 63.94 (C-4), 62.09 (C-6), 60.35 (C-6), 35.17 (C-2), 31.25 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.82 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.19 (C-2), 21.76 (COCH_3), 21.18 (COCH_3), 20.92 (COCH_3), 20.87 (COCH_3), 20.71 (COCH_3); **HRMS** obliczone dla $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: m/z 632.0922 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 632.0928.

3,4,6-tri-O-acetylo-1,2-dideoksy-2-jodo-N-(5-fenilo-1,3,4-tiadiazol-3-ylo)-D-galaktopiranozyloamina (Gal5)

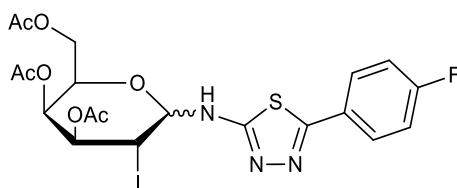
Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4,6-tri-O-acetylo-D-galaktal (**Gal3**: 264 mg, 0.970 mmol) i 2-amino-5-fenilo-1,3,4-tiadiazol (**Sub37**: 344 mg, 1.941 mmol). Otrzymano 106.5 mg **Gal5** z wydajnością 62%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 3.8:1$.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.65-7.63 (m, 2H, -Ph) 7.46-7.42 (m, 3H, -Ph), 6.23 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H-1 α), 5.94 (d, 1H, $J=10.8$ Hz, H-1 β), 5.76 (t, 1H, $J=3.2$ Hz, H-4 α), 5.45 (dd, 1H, $J=3.2$ Hz, 5.6Hz, H-3 α), 5.34-5.28 (m, 2H, H-4 β , H-3 β), 5.01-4.98 (m, 1H, H-2 α), 4.73-4.68 (m, 1H, H-6 $\alpha\alpha$), 4.52-4.47 (m, 1H, H-5 α), 4.42-4.38 (m, 1H, H-6 $\beta\alpha$), 4.27-4.11 (m, 4H, H-2 β , H-5 β , H-6 $\beta\beta$, H-6 $\beta\beta$), 2.24 (s, 3H, COCH₃ α), 2.20 (s, 3H, COCH₃ β), 2.09 (s, 6H, COCH₃ α , COCH₃ β), 2.08 (s, 3H, COCH₃ α), 2.04 (s, 3H, COCH₃ β); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 169.81 (C=OCH₃), 169.68 (C=OCH₃), 169.54 (C=OCH₃), 162.77 (-S-C=N), 147.21 (-N-C=N), 131.05 (-Ph), 129.53 (-Ph), 127.50 (-Ph), 83.28 (C-1), 73.79 (C-3), 71.35 (C-5), 68.13 (C-4), 62.65 (C-6), 24.97 (C-2), 21.24 (COCH₃), 20.62 (COCH₃), 20.54 (COCH₃); **HRMS** obliczone dla C₂₀H₂₂I₂N₃O₇S: m/z 576.0296 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 576.0312.

3,4,6-tri-O-acetylo-1,2-dideoxy-2-jodo-N-[5-(4-fluorofenylo)-1,3,4-tiadiazol-3-ylo]-D-galaktopiranozyloamina (Gal6)

Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4,6-tri-O-acetylo-D-galaktal (**Gal3**: 213 mg, 0.782 mmol) i 2-amino-5-(4-fluorofenylo)-1,3,4-tiadiazol (**Sub38**: 305 mg, 1.562 mmol). Otrzymano 68.7 mg **Gal6** z wydajnością 45%, w postaci żółtawego oleju jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 4:1$.

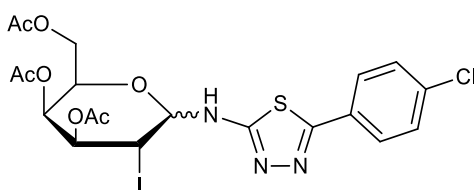


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.67-7.6 (m, 2H, -Ph), 7.37-7.36 (m, 2H, -Ph), 6.21 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, H-1 α), 5.94 (d, 1H, $J=10.4$ Hz, H-1 β), 5.75 (t, 1H, $J=3.2$ Hz, H-4 β), 5.44 (dd, 1H, $J=3.2$ Hz, 5.6Hz, H-4 α), 5.33-5.28 (m, 2H, H-3 β , H-3 α), 4.98 (dd, 1H, $J=3.2$ Hz, 8.8Hz, H-2 α), 4.81-4.75 (m, 2H, H-2 β , H-6 α), 4.51-4.46 (m, 1H, H-5 α), 4.36 (dd, 1H, $J=3.2$ Hz, 12.4Hz, 6 $\beta\alpha$), 4.27-4.12 (m, 3H, H-5 β , H-6 $\beta\beta$, H-6 $\beta\beta$), 2.24 (s, 6H, COCH₃ α , COCH₃ β),

2.24 (s, 6H, COCH₃α, COCH₃β), 2.20 (s, 6H, COCH₃α, COCH₃β), 2.09 (s, 3H, COCH₃α), 2.03 (s, 3H, COCH₃β); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 171.64 (C=O), 170.82 (C=O), 169.99 (C=O), 167.36 (d, J=151.0 Hz, C-F), 162.50 (-S-C=N), 145.96 (-N-C=N), 131.21 (-Ph), 129.52 (-Ph), 126.39 (-Ph), 82.98 (C-1), 72.92 (C-3), 71.83 (C-5), 68.58 (C-4), 63.83 (C-6), 24.99 (C-2), 21.87 (COCH₃), 20.92 (COCH₃), 20.77 (COCH₃); HRMS obliczone dla C₂₀H₂₁FIN₃O₇S: m/z 594.0202 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 594.0217.

3,4,6-tri-O-acetylo-1,2-dideoksy-2-jodo-N-[5-(4-chlorofenylo)-1,3,4-tiadiazol-3-ylo]-D-galaktopiranozyloamina (Gal7)

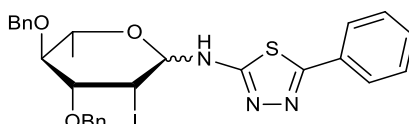
Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4,6-tri-O-acetylo-D-galaktal (**Gal3**: 202 mg, 0.742 mmol) i 2-amino-5-(4-chlorofenylo)-1,3,4-tiadiazol (**Sub39**: 314 mg, 1.483 mmol). Otrzymano 90.9 mg **Gal8** z wydajnością 58%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów α:β = 1.4:1.



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.66-7.63 (m, 2H, -Ph), 7.45-7.42 (m, 2H, -Ph), 6.45 (d, 1H, J=8.4 Hz, H-1α), 6.23 (d, 1H, J=8.4 Hz, H-1β), 5.74 (t, 1H, J=3.0 Hz, H-4α), 5.55-5.54 (m, 1H, J=3.0 Hz, H-4β), 5.45 (dd, 1H, J=3.0 Hz, 6.0 Hz, H-3α), 5.42-5.41 (m, 1H, H-3β), 5.00 (dd, 1H, J=3.0 Hz, 8.4 Hz, H-2α), 4.73-4.71 (m, 1H, H-2β), 4.50-4.47 (m, 1H, H-5α), 4.31 (t, 1H, J=6.0 Hz, H-6aα), 4.28-4.19 (m, 4H, H-5β, H-6bα, H-6aβ, H-6bβ), 2.26 (s, 3H, COCH₃β), 2.12 (s, 6H, COCH₃α, COCH₃β), 2.08 (s, 6H, COCH₃α, COCH₃β), 2.02 (s, 3H, COCH₃α); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 170.62 (C=O), 170.46 (C=O), 170.28 (C=O), 169.44 (C=O), 169.38 (C=O), 165.63 (-S-C=N), 145.57 (-N-C=N), 138.10 (C-Cl), 129.72 (-Ph), 129.57 (-Ph), 129.14 (-Ph), 128.07 (-Ph), 127.60 (-Ph), 99.08 (C-1), 80.52 (C-1), 74.16 (C-3), 72.93 (C-3), 69.77 (C-5), 66.21 (C-5), 64.08 (C-4), 62.03 (C-6), 60.26 (C-6), 29.84 (C-2), 25.71 (C-2), 21.27 (COCH₃), 21.13 (COCH₃), 20.90 (COCH₃), 20.89 (COCH₃), 20.74 (COCH₃); HRMS obliczone dla C₂₀H₂₁ClIN₃O₇S: m/z 609.9906 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 609.9917.

3,4-di-O-benzylo-1,2-dideoksy-2-jodo-N-(5-fenyl-1,3,4-tiadiazol-3-ylo)-L-ramnopiranozyloamina (Ram30)

Otrzymano zgodnie z procedurą 4. Do reakcji użyto 3,4-di-O-benzylo-L-ramnal (**Ram4**: 131 mg, 0.442 mmol) i 2-amino-5-fenyl-1,3,4-tiadiazol (**Sub37**: 197 mg, 0.844 mmol). Otrzymano 41.5 mg **Ram30** z wydajnością 42%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:1$.

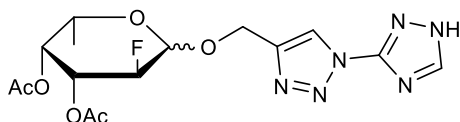


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.70-7.68 (m, 2H, -Ph), 7.47-7.42 (m, 6H, -Ph), 7.37-7.31 (m, 20H, -Ph), 5.99 (d, 1H, $J=10.2$ Hz, H-1), 5.08 (dd, 2H, $J=2.4$ Hz, 10.2 Hz, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.93-4.88 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.72-4.66 (m, 3H, H-2, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.62 (d, 1H, $J=9.6$ Hz, H-1 β), 4.21 (t, 1H, $J=10.2$ Hz, H-2 β), 3.90 (t, 1H, $J=9.6$ Hz, H-3), 3.82 (dd, 1H, $J=9.0$ Hz, 10.8 Hz, H-3), 3.72 (m, 1H, H-5), 3.62 (dq, 1H, $J=6.6/6.0$ Hz, 9.6 Hz, H-5), 3.33 (dt, 2H, $J=9.0$ Hz, 14.4 Hz, H-4), 1.37 (d, 3H, $J=6.6$ Hz, CH_3), 1.33 (d, 3H, $J=6$ Hz, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 160.81 (-S-C=N), 148.52 (-N-C=N), 138.13 (-Ph), 138.07 (-Ph), 130.78 (-Ph), 130.35 (-Ph), 129.05 (-Ph), 128.72 (-Ph), 128.69 (-Ph), 128.56 (-Ph), 128.30 (-Ph), 128.15 (-Ph), 126.57 (-Ph), 95.52 (C-1), 94.96 (C-1), 86.42 (C-3), 85.17 (C-3), 85.04 (C-4), 75.50 (C-5), 74.38 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 73.95 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 37.69 (C-2), 31.10 (C-2), 17.91 (C-6); **HRMS** obliczone dla $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{I}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: m/z 614.0969 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; wyznaczone m/z 614.0972.

1-[1-(1H-1,2,4-triazol-3-ylo)-1H-1,2,3-triazol-4-ylo]-metyleno-3,4-di-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozyd (Fuk16)

Procedura 15^[113]: Propargilo 3,4-di-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozyd (**Fuk7**: 39.8 mg, 0.138 mmol) oraz 3-azydo-1H-1,2,4-triazol (**Sub29**: 15.2 mg, 0.138 mmol) rozpuszczono w izopropanolu (1 mL) i THF (1 mL). $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (7.0 mg, 0.028 mmol) oraz askorbinian sodu (2.8 mg, 0.014 mmol) rozpuszczono w wodzie (po 0.5 mL każdy) w dwóch osobnych naczyniach, zmieszano ze sobą i dodano do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24h, kontrolując stopień jej przereagowania metodą TLC (toluen:AcOEt 2:1, v/v). Produkt

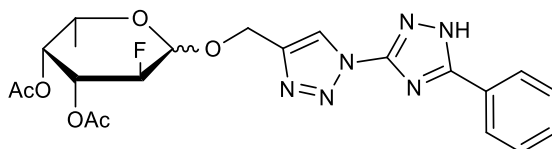
zateżono na wyparce rotacyjnej i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie toluen:AcOEt (100:1, v/v), otrzymując 42.9 mg **Fuk16** z wydajnością 78%, w postaci bezbarwnego krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1.5:1$.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 13.52 (bs, 1H, $-\text{NH}-$), 8.24 (s, 1H, 1,2,4-triazol), 7.42-7.51 (m, 1H, H-5(1,2,3-triazol)), 5.48 (d, 1H, $J=3.7$ Hz, H-1 β), 5.37 (d, 1H, $J=3.7$ Hz, H-1 α), 5.28-5.32 (m, 2H, H-3 α , H-3 β), 5.03-5.08 (m, 2H, H-4 α , H-4 β), 4.89 (dd, $J=3.6$ Hz, 10.0 Hz, 1H, H-2 β), 4.68-4.73 (m, 1H, H-2 α), 4.46 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.05-4.14 (m, 3H, H-2 α , H-2 β , H-5 α), 89 (dq, $J=0.8$ Hz, 6.4 Hz, 1H, H-5 β), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 1.23 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6 β), 1.15 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, H-6 α); **$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):** δ 170.42 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 170.34 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 170.25 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 169.84 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 156.91 (C-3(1,2,4-triazol)), 156.76 (C-3(1,2,4-triazol)), 150.67 (C-5(1,2,4-triazol)), 149.54 (C-5(1,2,4-triazol)), 146.83 (C-4(1,2,3-triazol)), 146.72 (C-4(1,2,3-triazol)), 125.08 (C-5(1,2,3-triazol)), 124.77 (C-5(1,2,3-triazol)), 92.65 (d, $J=25.4$ Hz, C-1), 89.56 (d, $J=22.3$ Hz, C-1), 86.64 (d, $J=63.8$ Hz, C-2), 84.67 (d, $J=66.8$ Hz, C-2), 71.15 (C-4), 70.75 (C-4), 69.84 (C-3), 69.57 (C-3), 68.81 (C-5), 67.13 (C-5), 54.72 ($-\text{CH}_2-$), 52.39 ($-\text{CH}_2-$), 21.14 (COCH_3), 21.02 (COCH_3), 20.84 (COCH_3), 20.58 (COCH_3), 16.25 (C-6), 15.61 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{FN}_6\text{O}_6$: m/z 399.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 398.7.

1-[1-(5-fenyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-metenlo-3,4-di-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozyd (Fuk17)

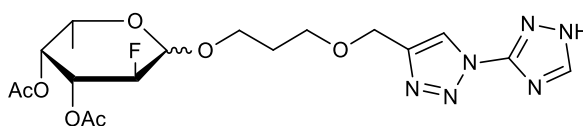
Otrzymano zgodnie z Procedurą 15. Do reakcji użyto propargilo 3,4-di-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozyd (**Fuk7**: 40.3 mg, 0.140 mmol) oraz 3-azydo-5-fenyl-1H-1,2,4-triazol (**Sub31**: 26.1 mg, 0.140 mmol). Otrzymano 49.1 mg **Fuk17** z wydajnością 74%, w postaci bezbarwnego krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1.5:1$.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.47 (bs, 1H, -NH-), 7.52-7.92 (m, 12H, -Ph, H-5(1,2,3-triazol)), 5.74 (dd, 1H, $J=3.6$ Hz, 7.6 Hz, H-1 α), 5.58 (d, 1H, $J=3.6$ Hz, H-1 β), 5.23-5.28 (m, 2H, H-4 α , H-4 β), 5.07-5.13 (m, 2H, H-3 α , H-3 β), 4.92-4.99 (m, 1H, H-2 β), 4.58-4.62 (m, 1H, H-2 α), 4.37 (s, 2H, -CH₂-), 4.18-4.23 (m, 1H, H-5 α), 3.89 (dq, $J=1.2$ Hz, 6.0 Hz, 1H, H-5 β), 2.18 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 1.97 (s, 3H, OAc), 1.21 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, H-6 β), 1.12 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, H-6 α); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 171.24 (C=OCH₃), 170.48 (C=OCH₃), 170.23 (C=OCH₃), 169.85 (C=OCH₃), 156.48 (C-5(1,2,4-triazol)), 154.65 (C-5(1,2,4-triazol)), 152.57 (C-3(1,2,4-triazol)), 152.32 (C-3(1,2,4-triazol)), 151.44 (C-4(1,2,3-triazol)), 151.12 (C-4(1,2,3-triazol)), 131.61 (-Ph), 130.92 (-Ph), 130.08 (-Ph), 129.74 (-Ph), 129.21 (-Ph), 128.64 (-Ph), 128.36 (-Ph), 127.33 (-Ph), 126.15 (-Ph), 125.35 (-Ph), 124.82 (-Ph), 124.25 (-Ph), 122.36 (C-5(1,2,3-triazol)), 121.20 (C-5(1,2,3-triazol)), 97.49 (d, $J=24.8$ Hz, C-1), 90.88 (d, $J=27.5$ Hz, C-1), 87.55 (d, $J=64.3$ Hz, C-2), 84.42 (d, $J=65.8$ Hz, C-2), 72.43 (C-4), 71.22 (C-4), 69.71 (C-3), 68.48 (C-3), 68.16 (C-5), 67.94 (C-5), 56.71 (-CH₂-), 55.84 (-CH₂-), 21.14 (COCH₃), 21.03 (COCH₃), 20.84 (COCH₃), 20.72 (COCH₃), 16.10 (C-6), 15.77 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₂₁H₂₃FN₆O₆: m/z 475.2 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 474.9.

1-{3-[1-(1H-1,2,4-triazol-3-ylo)-1H-1,2,3-triazol-4-ylo]-metylenoksy}propylo-3,4-di-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozyd (Fuk18)

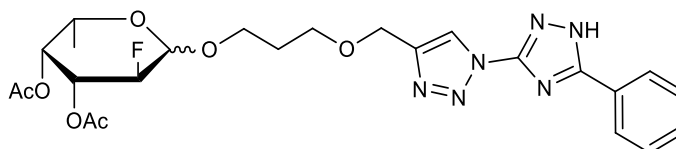
Otrzymano zgodnie z Procedurą 15. Do reakcji użyto 3-prop-2-ynoksypropylo 3,4-di-O-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-L-fukopiranozyd (**Fuk8**: 23.7 mg, 0.068 mmol) oraz 3-azydo-1H-1,2,4-triazol (**Sub29**: 7.5 mg, 0.068 mmol). Otrzymano 23.7 mg **Fuk18** z wydajnością 76%, w postaci bezbarwnego krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1.5:1$.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 10.13 (bs, 1H, -NH-), 8.55 (s, 1H, H-5(1,2,4-triazol)), 7.36-7.41 (m, 1H, H-5(1,2,3-triazol)), 5.92 (d, 1H, *J*=5.4 Hz, H-1α), 5.62 (d, 1H, *J*=2.8 Hz, H-1β), 5.37-5.41 (m, 2H, H-3α, H-3β), 4.82-4.86 (m, 1H, H-4α, H-4β), 4.60-4.67 (m, 2H, H-2α, H-2β), 4.20-4.23 (m, 1H, H-5α), 3.92 (dq, *J*=1.2 Hz, 6.0 Hz, 1H, H-5β) 3.65-3.69 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 3.52-3.58 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 2.21 (s, 3H, OAc), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 1.84-1.87 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 1.23 (d, 3H, *J*=6.0 Hz, H-6β), 1.15 (d, 3H, *J*=6.0 Hz, H-6α); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 170.52 (C=OCH₃), 170.13 (C=OCH₃), 169.34 (C=OCH₃), 169.12 (C=OCH₃), 156.52 (C-3(1,2,4-triazol)), 149.91 (C-5(1,2,4-triazol)), 147.65 (C-4(1,2,3-triazol)), 125.15 (C-5(1,2,3-triazol)), 92.82 (d, *J*=24.6 Hz, C-1), 91.95 (d, *J*=24.2 Hz, C-1), 89.46 (d, *J*=64.5 Hz, C-2), 88.71 (d, *J*=61.5 Hz, C-2), 71.48 (C-3), 71.14 (C-3), 69.22 (C-4), 68.89 (C-4), 68.52 (C-5), 68.28 (C-5), 67.62 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 62.54 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 57.22 (-CH₂-), 56.17 (-CH₂-), 35.92 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 21.34 (COCH₃), 20.88 (COCH₃), 20.76 (COCH₃), 20.60 (COCH₃), 16.29 (C-6), 15.36 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₈H₂₅FN₆O₇: *m/z* 479.2 [M+Na]⁺; wyznaczone *m/z* 479.3.

1-{3-[1-(5-fenyl-1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]-metylenoksy}propylo-3,4-di-*O*-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-*L*-fukopiranozyd (Fuk19)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 15. Do reakcji użyto 3-prop-2-ynoksypropylo 3,4-di-*O*-acetylo-2-deoksy-2-fluoro-*L*-fukopiranozyd (**Fuk8**: 24.2 mg, 0.070 mmol) oraz 3-azydo-5-fenyl-1*H*-1,2,4-triazol (**Sub31**: 13.0 mg, 0.070 mmol). Otrzymano 26.4 mg **Fuk19** z wydajnością 71%, w postaci bezbarwnego krzepnącego oleju, jako mieszaninę anomerów α:β = 1.5:1.

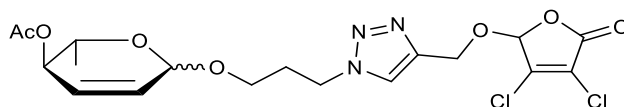


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.28 (bs, 1H, -NH-), 7.97-7.99 (m, 2H, -Ph), 7.58-7.61 (m, 3H, -Ph), 5.92 (d, 1H, *J*=5.4 Hz, H-1α), 5.62 (d, 1H, *J*=2.8 Hz, H-1β), 5.37-3.40 (m, 2H, H-3α, H-3β), 4.89-4.92 (m, 2H, H-4α, H-4β), 4.64-4.69 (m, 2H, H-2α, H-2β), 4.13 (q, 1H, *J*=6.4 Hz, H-5α), 3.89 (dq, 1H, *J*=1.2 Hz, 6.4 Hz, H-5β), 3.58-3.62 (m, 2H,

-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 3.53-3.55 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 2.19 (s, 3H, OAc), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 1.77-1.81 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 1.24 (d, 3H, *J*=6.4 Hz, H-6β), 1.16 (d, 3H, *J*=6.4 Hz, H-6α); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.45 (C=O), 170.18 (C=O), 169.84 (C=O), 155.67 (C-5(1,2,4-triazol)), 151.84 (C-3(1,2,4-triazol)), 146.84 (C-4(1,2,3-triazol)), 130.26 (-Ph), 129.65 (-Ph), 129.33 (-Ph), 127.47 (-Ph), 126.20 (-Ph), 124.70 (-Ph), 124.24 (C-5(1,2,3-triazol)), 91.62 (d, *J*=22.1 Hz, C-1), 90.74 (d, *J*=24.6 Hz, C-1), 89.88 (d, *J*=64.6 Hz, C-2), 89.62 (d, *J*=62.8 Hz, C-2), 71.02 (C-4), 70.49 (C-4), 69.41 (C-3), 68.87 (C-3), 68.52 (C-5), 68.25 (C-5), 67.28 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 61.92 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 58.84 (-CH₂-), 36.84 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 20.92 (COCH₃), 20.64 (COCH₃), 20.21 (COCH₃), 16.28 (C-6), 15.55 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₂₄H₂₉FN₆O₇: m/z 555.2 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 555.5.

4-O-acetylo-{3-[4-(3,4-dichloro-furan-2(5H)-on-5-oksy)metyleno-1H-1,2,3-triazol-1-ylo]-propylo}-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram31)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z 3-azydopropylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozydu (**Ram6**: 75.4 mg, 0.295 mmol) i 3,4-dichloro-5-propargiloksyfuran-2(5H)-onu (**Sub33**: 61.1 mg, 0.295 mmol). Otrzymano 118.8 mg **Ram31** z wydajnością 87%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów α:β = 1:6.

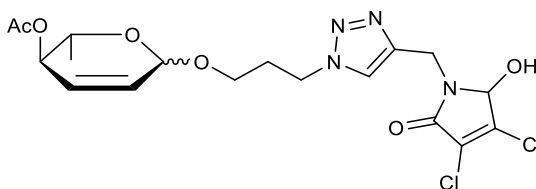


¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ 7.71 (s, 1H, H-5(triazol)), 5.94 (m, 1H, H-5(furanon)), 5.85-5.87 (m, 1H, H-3), 5.78-5.81 (m, 1H, H-2), 5.04-5.07 (m, 1H, H-4), 4.98-5.01 (m, 2H, -C-CH₂-N<), 4.96 (m, 1H, H-1), 3.94 (dq, *J*=6.0 Hz, 9.0 Hz, 1H, H-5), 3.87 (dt, *J*=6.0 Hz, 10.2 Hz, 1H, -O-CH₂-CH₂-CH_{2a}-N-), 3.57 (dt, *J*=6.0 Hz, 9.6 Hz, Hz, 1H, -O-CH₂-CH₂-CH_{2b}-N-), 3.40-3.43 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 2.09 (s, 3H, OAcα), 2.08 (s, 3H, OAcβ), 1.87-1.91 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 1.31 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, H-6β), 1.23 (d, *J*=6.0 Hz, 3H, H-6α); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): δ 170.61 (C=O), 162.36 (C-2(furanon)), 147.03 (C-4(furanon)), 140.42 (C-4(1,2,3-triazol)), 131.08 (C-3), 129.99 (C-3), 127.74 (C-2), 126.91 (C-2), 125.17 (C-3(furanon)), 102.12 (C-5(furanon)), 94.61 (C-1), 70.90 (C-4), 70.19 (C-4), 69.81 (C-5), 68.28 (C-5), 65.19 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 55.19 (-CH₂-),

48.69 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 29.44 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 21.92 (COCH₃), 20.86 (COCH₃), 18.75 (C-6), 18.12 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₈H₂₁Cl₂N₃O₇: m/z 462.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 462.0.

4-O-acetylo-{3-[4-(3,4-dichloro-5-hydroksy-1H-pirol-2(5H)-on-1-ylo)metyleno-1H-1,2,3-triazol-1-ylo]-propylo}-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyd (Ram32)

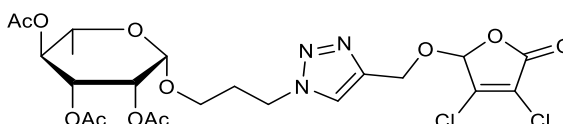
Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z 3-azydopropylo 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozydu (**Ram6**: 75.3 mg, 0.295 mmol) i 3,4-dichloro-5-hydroksy-1-propargilo-1H-pirol-2(5H)-onu (**Sub35**: 60.8 mg, 0.295 mmol). Otrzymano 119.7 mg **Ram32** z wydajnością 79%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:5$.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.59 (s, 1H, H-5(triazol)), 6.70 (d, $J=2.8$ Hz, 1H, H-5(pirol)), 5.85-5.88 (m, 1H, H-3), 5.76-5.80 (m, 1H, H-2), 5.03-5.06 (m, 1H, H-4), 4.93 (m, 1H, H-1), 4.80 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, =C-CH_a-N<), 4.57 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, =C-CH_b-N<), 4.46 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 3.92 (dq, $J=6.4$ Hz, 9.2 Hz, 1H, H-5), 3.76-3.82 (m, 1H, -O-CH_a-CH₂-CH₂-N-), 3.43-3.49 (m, 1H, -O-CH_b-CH₂-CH₂-N-), 2.19 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 1.30 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-6 β), 1.21 (d, $J=6.0$ Hz, 3H, H-6 α); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)**: δ 170.65 (C=O), 170.28 (C=O), 163.26 (C-2(pirol)), 143.01 (C-3(pirol)), 140.91 (C-4(1,2,3-triazol)), 130.08 (C-5(1,2,3-triazol)), 128.36 (C-3), 127.50 (C-3), 126.82 (C-2), 125.49 (C-2), 124.52 (C-4(pirol)), 94.76 (C-1), 91.13 (C-1), 80.33 (C-5(pirol)), 70.94 (C-4), 69.88 (C-4), 68.92 (C-5), 65.24 (C-5), 64.71 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 47.69 (-O-CH₂-CH₂-UH₂-N-), 36.96 (-CH₂-), 30.54 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 21.22 (COCH₃), 20.75 (COCH₃), 18.17 (C-6), 17.92 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₈H₂₂Cl₂N₄O₆: m/z 461.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 461.4.

2,3,4-tri-O-acetylo-β-L-ramnopiranozyd (Ram33)

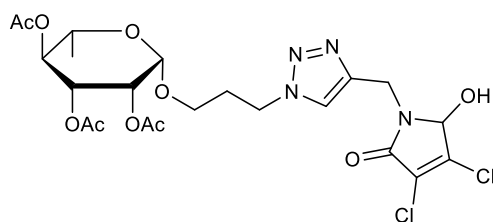
Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z 3-azydopropylo 2,3,4-tri-O-acetylo-β-L-ramnopiranozydu (**Ram8**: 80.2 mg, 0.215 mmol) i 3,4-dichloro-5-propargiloksyfuran-2(5H)-onu (**Sub33**: 44.5 mg, 0.215 mmol). Otrzymano 114.7 mg **Ram33** z wydajnością 92%, w postaci bezbarwnego oleju, jako anomer β; $\alpha^{22}_D = 34.7$ (c = 0.5, CHCl₃).



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.71 (s, 1H, H-5(triazol)), 6.01 (d, J=1.8 Hz, 1H, H-5(furanon)), 5.22-5.25 (m, 1H, H-4), 5.19-5.21 (m, 1H, H-2), 5.07 (t, 1H, J=10.2 Hz, 1H, H-3), 4.99-5.03 (m, 2H, -C-CH₂-N<), 4.69 (m, 1H, H-1), 4.50-4.57 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 3.81-3.86 (m, 1H, H-5), 3.75-3.78 (m, 1H, -O-CH_b-CH₂-CH₂-N-), 3.38-3.42 (m, 1H, -O-CH_a-CH₂-CH₂-N-), 2.22-2.29 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.22 (d, J=6.6 Hz, 3H, H-6); **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ 170.42 (C=O), 170.37 (C=O), 170.18 (C=O), 162.25 (C-2(furanon)), 146.86 (C-4(furanon)), 139.92 (C-4(1,2,3-triazol)), 131.32(C-5(1,2,3-triazol)), 124.15 (C-3(furanon)), 100.27 (C-5(furanon)), 97.76 (C-1), 71.09 (C-4), 69.88 (C-3), 69.26 (C-2), 66.97 (C-5), 64.53 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 63.37 (-CH₂-), 47.79 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 29.92 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 21.06 (COCH₃), 21.07 (COCH₃), 20.92 (COCH₃), 17.54 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₂₂H₂₇Cl₂N₃O₁₁: m/z 580.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 580.4.

2,3,4-tri-O-acetylo-β-L-ramnopiranozyd (Ram34)

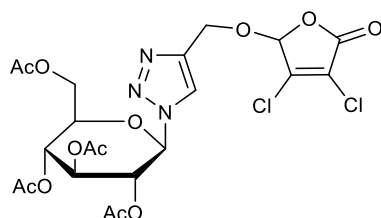
Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z 3-azydopropylo 2,3,4-tri-O-acetylo-β-L-ramnopiranozydu (**Ram8**: 80.9 mg, 0.217 mmol) i 3,4-dichloro-5-hydroksy-1-propargilo-1H-pirol-2(5H)-onu (**Sub35**: 44.7 mg, 0.217 mmol). Otrzymano 104.2 mg **Ram34** z wydajnością 83%, w postaci żółtawego oleju, jako anomer β; $\alpha^{25}_D = -26.9$ (c = 1.0, CHCl₃).



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.70 (d, *J*=3.6 Hz, 1H, H-5(triazol)), 5.53 (d, *J*=4.2 Hz, 1H, H-5(piról)), 5.12-5.19 (m, 2H, H-1, H-3), 5.04 (dt, *J*=2.4 Hz, 9.6 Hz, 1H, H-2), 4.81 (dd, *J*=8.4 Hz, 15.6 Hz, 1H, =C-CH_a-N<), 4.66-4.70 (m, 2H, H-4, =C-CH_b-N<), 4.42-4.50 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 3.78-3.83 (m, 1H, -O-CH_a-CH₂-CH₂-N-), 3.72-3.76 (m, 1H, H-5), 3.38-3.42 (m, 1H, -O-CH_b-CH₂-CH₂-N-), 2.17-2.26 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 2.13 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 1.98 (s, 3H, OAc), 1.19 (dd, *J*=1.8 Hz, 6.0 Hz, 3H, H-6); **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ 170.52 (C=OCH₃), 170.44 (C=OCH₃), 170.16 (C=OCH₃), 162.83 (C-2(piról)), 144.29 (C-3(piról)), 143.16 (C-4(1,2,3-triazol)), 129.17 (C-5(1,2,3-triazol)), 123.54 (C-4(piról)), 97.79 (C-1), 82.34 (C-5(piról)), 70.92 (C-4), 69.87 (C-2), 69.34 (C-3), 66.87 (C-5), 64.76 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 47.93 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 35.79 (-CH₂-), 29.80 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 21.04 (COCH₃), 20.98 (COCH₃), 20.92 (COCH₃), 17.54 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₂₂H₂₈Cl₂N₄O₁₀: m/z 579.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 580.0.

4-(3,4-dichloro-furan-2(5H)-on-5-oksymetyleno)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylo)-1H-1,2,3-triazol (Glu11)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z azydku 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylowego (**Glu6**: 60.6 mg, 0.162 mmol) i 3,4-dichloro-5-propargiloksyfuran-2(5H)-onu (**Sub33**: 33.5 mg, 0.162 mmol). Otrzymano 70.7 mg **Glu11** z wydajnością 85%, w postaci żółtawego oleju, jako anomer β; α²⁴_D = -8.1 (c = 1.0, CHCl₃).

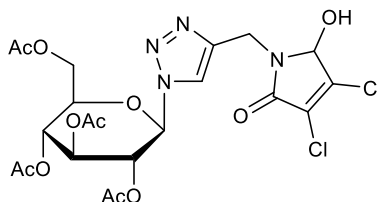


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.88 (d, *J*=5.2 Hz, 1H, H-5(triazol)), 5.95 (d, *J*=6.4 Hz, 1H, H-5(furanon)), 5.89 (d, *J*=9.2 Hz, 1H, H-1), 5.45-5.36 (m, 2H, -CH₂-), 5.25 (t, *J*=9.6 Hz, 1H,

H-2), 5.04-4.95 (m, 2H, H-3, H-4), 4.32 (dd, $J=5.2$ Hz, 12.8 Hz, 1H, H-6a), 4.16 (dd, $J=2.0$ Hz, 12.8 Hz, 1H, H-6b), 4.02 (ddd, $J=2.4$ Hz, 5.2 Hz, 10.4 Hz, 1H, H-5), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.89 (s, 3H, OAc); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 170.62 ($\text{C}=\text{O}$), 170.06 ($\text{C}=\text{O}$), 169.54, ($\text{C}=\text{O}$) 169.17 ($\text{C}=\text{O}$), 163.14 (C-2(furanon)), 147.58 (C-4(1,2,3-triazol)), 138.07 (C-4(furanon)), 122.24 (C-3(furanon)), 99.74 (C-5(1,2,3-triazol)), 86.18 (C-5(furanon)), 86.15 (C-1), 75.42 (C-2), 72.66 (C-3), 70.61 (C-4), 67.80 (C-5), 62.84 (C-6), 61.65 ($-\text{CH}_2-$), 20.89 (COCH_3), 20.73 (COCH_3), 20.66 (COCH_3), 20.32 (COCH_3); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_{12}$: m/z 580.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 581.0.

4-(3,4-dichloro-5-hydroksy-1H-pirol-2(5H)-on-1-ylometyleno)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo- β -D-glukopiranozylo)-1H-1,2,3-triazol (Glu12)

Otrzymano zgodnie z Procedura 15 z azydku 2,3,4,6-tetra-O-acetylo- β -D-glukopiranozylowego (**Glu6**: 59.7 mg, 0.160 mmol) i 3,4-dichloro-5-hydroksy-1-propargilo-1H-pirol-2(5H)-onu (**Sub35**: 33.0 mg, 0.160 mmol). Otrzymano 64.0 mg **Glu12** z wydajnością 75%, w postaci żółtawego oleju, jako anomer β ; $\alpha^24_{\text{D}} = -26.1$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

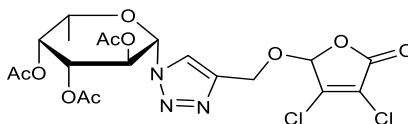


^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 7.76 (bs, 1H, H-5(triazol)), 5.84 (m, 1H, H-5(pirol)), 5.41-5.45 (m, 2H, $=\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}<$), 5.29-5.35 (m, 1H, H-1), 5.24 (t, $J=9.6$ Hz, 1H, H-2), 4.72-4.85 (m, 2H, H-3, H-4), 4.30-4.33 (m, 1H, H-6a), 4.16 (d, $J=12.6$ Hz, 1H, H-5), 4.01-4.04 (m, 1H, H-6b), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 170.72 ($\text{C}=\text{O}$), 170.72 ($\text{C}=\text{O}$), 169.56 ($\text{C}=\text{O}$), 169.29 ($\text{C}=\text{O}$), 162.83 (C-2(pirol)), 144.26 (C-3(pirol)), 144.08 (C-4(1,2,3-triazol)), 129.26 (C-5(1,2,3-triazol)), 126.57 (C-4(pirol)), 86.35 (C-1), 82.48 (C-5(pirol)), 75.51 (C-2), 72.33 (C-3), 70.90 (C-4), 67.78 (C-5), 61.63 (C-6), 35.55 ($-\text{CH}_2-$),

20.81 (COCH₃), 20.72 (COCH₃), 20.66 (COCH₃), 20.48 (COCH₃); **MS(ESI)**: obliczone dla C₂₁H₂₄Cl₂N₄O₁₁: m/z 579.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 579.4.

4-(3,4-dichloro-furan-2(5H)-on-5-oksy)metyleno)-1-(2,3,4-tri-O-acetylo-β-L-fukopiranozylo)-1H-1,2,3-triazol (Fuk20)

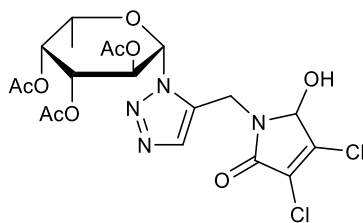
Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z azydku 2,3,4-tri-O-acetylo-β-L-fukopiranozylowego (**Fuk6**: 50.2 mg, 0.159 mmol) i 3,4-dichloro-5-propargiloksyfuran-2(5H)-onu (**Sub33**: 32.9 mg, 0.159 mmol). Otrzymano 70.7 mg **Fuk35** z wydajnością 78%, w postaci bezbarwnego, krzepnącego oleju, jako anomer β, α²⁴_D = -35.5 (c = 1.0, CHCl₃).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.95 (d, J=3.2 Hz, 1H, H-5(triazol)), 5.95 (d, J=4.8 Hz, 1H, H-5(furanon)), 5.82 (d, J=9.2 Hz, 1H, H-1), 5.40-5.51 (m, 2H, -CH₂-), 5.23-5.27 (m, 1H, H-2) 4.98-5.01 (m, 2H, H-3, H-4), 4.13 (dq, J=6.0 Hz, 6.8 Hz, 1H, H-5), 2.24 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.90 (s, 3H, OAc), 1.28 (d, J=6.4 Hz, 3H, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.51 (COCH₃), 170.44 (COCH₃), 170.07 (COCH₃), 163.23 (C-2(furanon)), 143.35 (C-4(furanon)), 129.78 (C-4(1,2,3-triazol)), 122.46 (C-3(furanon)), 99.57 (C-5(furanon)), 86.74 (C-1), 73.17 (C-5(furanon)), 71.19 (C-4), 69.93 (C-2), 68.46 (C-3), 68.35 (C-5), 62.84 (-CH₂-), 20.83 (COCH₃), 20.76 (COCH₃), 20.49 (COCH₃), 16.28 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₉H₂₁Cl₂N₃O₁₀: m/z 544.0 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 544.4.

4-(3,4-dichloro-5-hydroksy-1H-pirol-2(5H)-on-1-ylo)metyleno)-1-(2,3,4-tri-O-acetylo-β-L-fukopiranozylo)-1H-1,2,3-triazol (Fuk21)

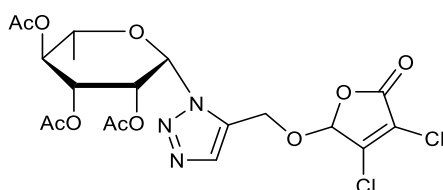
Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z azydku 2,3,4-tri-O-acetylo-β-L-fukopiranozylowego (**Fuk6**: 50.8 mg, 0.161 mmol) i 3,4-dichloro-5-hydroksy-1-propargilo-1H-pirol-2(5H)-onu (**Sub35**: 33.2 mg, 0.161 mmol). Otrzymano 57.1 mg **Fuk36** z wydajnością 68%, w postaci żółtawego oleju, jako anomer β. α²³_D = 24.9 (c = 1.0, CHCl₃).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.86 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, H-5(triazol)), 5.74-5.77 (m, 2H, H-1, H-5(pirol)), 5.36-5.47 (m, 2H, =C-CH₂-N<), 5.22 (dd, *J*=3.2 Hz, 10.2 Hz, 1H, H-2), 4.87 (d, *J*=15.6 Hz, 1H, H-3), 4.54 (dd, *J*=15.6 Hz, 21.6 Hz, 1H, H-4), 4.10 (q, *J*=6.0 Hz, 1H, H-5), 2.25 (s, 3H, OAc), 2.17 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.25 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, H-6); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 170.52 (C=O), 170.07 (C=O), 169.34 (C=O), 163.16 (C-2(pirol)), 143.12 (C-3(pirol)), 141.04 (C-4(1,2,3-triazol)), 128.17 (C-5(1,2,3-triazol)), 121.60 (C-4(pirol)), 86.56(C-5(pirol)), 80.29 (C-1), 73.08 (C-4), 71.22 (C-2), 69.93 (C-3), 68.36 (C-5), 36.67 (-CH₂-), 20.96 (COCH₃), 20.83 (COCH₃), 20.72 (COCH₃), 16.28 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₉H₂₂Cl₂N₄O₉: m/z 521.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 521.2.

4-(3,4-dichloro-furan-2(5H)-on-5-oksy)metyleno)-1-(2,3,4-tri-O-acetylo-β-L-ramopiranozylo)-1H-1,2,3-triazol (Ram35)

Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z azydku 2,3,4-tri-O-acetylo-L-ramnopyranozylowego (**Ram7**: 55.0 mg, 0.174 mmol) i 3,4-dichloro-5-propargiloksyfuran-2(5H)-onu (**Sub33**: 36.0 mg, 0.174 mmol). Otrzymano 64.9 mg **Ram35** z wydajnością 79%, w postaci żółtawego oleju, jako amoner β. α²⁴_D = -35.5 (c = 1.0, CHCl₃).

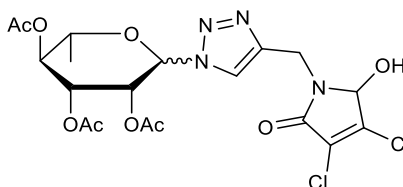


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.95 (d, *J*=3.2 Hz, 1H, H-5(triazol)), 5.95 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, H-5(furanon)), 5.82 (d, *J*=9.2 Hz, 1H, H-1), 5.51-5.40 (m, 2H, H-2, H-4), 5.26-5.27 (m, 1H, H-3), 4.95-5.04 (m, 2H, -CH₂-), 4.13 (q, *J*=6.8 Hz, 1H, H-5), 2.24 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.90 (s, 3H, OAc), 1.28 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, H-6); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** 170.44 (C=O), 170.06 (C=O), 169.51 (C=O), 163.28 (C-2(furanon)), 147.64 (C-4(furanon)), 142.85 (C-4(1,2,3-triazol)), 125.42 (C-3(furanon)), 122.46 (C-5(1,2,3-triazol)), 99.79

(C-5(furanon)), 86.68 (C-1), 73.08 (C-4), 71.16 (C-3), 70.05 (C-2), 68.32 (C-5), 62.87 (-CH₂-), 20.86 (COCH₃), 20.74 (COCH₃), 20.46 (COCH₃), 16.22 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₉H₂₁Cl₂N₃O₁₀: m/z 522.1 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 522.9.

4-(3,4-dichloro-5-hydroksy-1H-pirol-2(5H)-on-1-ylometyleno)-1-(2,3,4-tri-O-acetylo-L-ramnopiranozylo)-1H-1,2,3-triazol (Ram36)

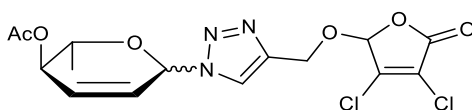
Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z azydku 2,3,4-tri-O-acetylo-L-ramnopiranozyłowego (**Ram7**: 55.2 mg, 0.175 mmol) i 3,4-dichloro-5-hydroksy-1-propargilo-1H-pirol-2(5H)-onu (**Sub35**: 36.1 mg, 0.175 mmol). Otrzymano 62.1 mg **Ram36** z wydajnością 71%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:3$.



¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.86 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, H-5(triazole- α)), 7.79 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, H-5(triazole- β)), 6.71 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-5(pirol- β)), 6.67 (s, 1H, H-5(pirol- α)), 6.13 (dd, $J=2.4$ Hz, 4.4 Hz, 1H, H-1 β), 5.74-5.79 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, H-1 α), 5.15-5.23 (m, 2H, H-2 α , H-2 β), 4.77-4.87 (m, 2H, H-4 α , H- β), 4.61-4.65 (m, 2H, H-3 α , H- β), 4.49-4.89 (m, 2H, -CH₂-), 4.34 (q, $J=4.8$ Hz, 10.8 Hz, 1H, H-5 β), 4.10 (q, $J=6.0$ Hz, 13.2 Hz, 1H, H-5 α), 2.25 (s, 3H, OAc α), 2.18 (s, 3H, OAc α), 2.17 (s, 3H, OAc α), 2.14 (s, 3H, OAc β), 2.10 (s, 3H, OAc β), 2.09 (s, 3H, -OH α), 1.99 (s, 3H, OAc β), 1.30 (d, $J=6.0$ Hz, 3H, H-6 β), 1.25 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-6 α); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 170.52 (C=OCH₃), 170.17 (C=OCH₃), 170.09 (C=OCH₃), 169.53 (C=OCH₃), 169.38 (C=OCH₃), 163.12 (C-2(pirol)), 143.10 (C-3(pirol)), 141.06 (C-4(1,2,3-triazol)), 128.07 (C-5(1,2,3-triazol)), 126.73 (C-4(pirol)), 92.09 (C-1), 86.52 (C-1), 80.26 (C-5(pirol)), 79.97 (C-4), 73.04 (C-4), 72.92 (C-3), 71.21 (C-3), 71.15 (C-2), 70.05 (C-2), 68.92 (C-5), 68.36 (C-5), 36.74 (-CH₂-), 36.67 (-CH₂-), 21.28 (COCH₃), 20.82 (COCH₃), 20.93 (COCH₃), 20.65 (COCH₃), 20.42 (COCH₃), 20.38 (COCH₃), 16.46 (C-6), 16.21 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla C₁₉H₂₂Cl₂N₄O₉: m/z 521.1 [M+H]⁺;wyznaczono: m/z 521.9.

4-(3,4-dichloro-furan-2(5H)-on-5-oksy)metyleno)-1-(4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozylo)-1H-1,2,3-triazol (Ram37)

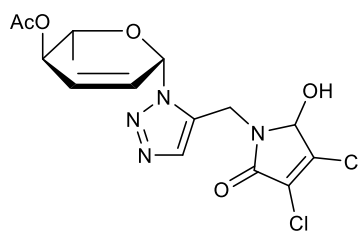
Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z azydku 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozylowego (**Ram5**: 64.8 mg, 0.329 mmol) i 3,4-dichloro-5-propargiloksyfuran-2(5H)-onu (**Sub33**: 68.1 mg, 0.329 mmol). Otrzymano 98.3 mg **Ram37** z wydajnością 74%, w postaci żółtawego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:11$.



$^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): δ 7.71 (s, 1H, H-5(triazol)), 5.94 (m, 1H, H-5(furanon)), 5.85-5.87 (m, 1H, H-3), 5.78-5.81 (m, 1H, H-2), 5.04-5.07 (m, 1H, H-4), 4.98-5.01 (m, 2H, -C-CH₂-N<), 4.96 (m, 1H, H-1), 3.94 (dq, $J=6.0$ Hz, 9.0 Hz, 1H, H-5), 3.87 (dt, $J=6.0$ Hz, 10.2 Hz, 1H, -O-CH₂-CH₂-CH_{2a}-N-), 3.57 (dt, $J=6.0$ Hz, 9.6 Hz, Hz, 1H, -O-CH₂-CH₂-CH_{2b}-N-), 3.40-3.43 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 2.09 (s, 3H, OAc α), 2.08 (s, 3H, OAc β), 1.87-1.91 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-N-), 1.31 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-6 β), 1.23 (d, $J=6.0$ Hz, 3H, H-6 α); $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, CDCl_3): δ 171.21 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 170.67 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 162.32 (C-2(furanon)), 147.06 (C-5(1,2,3-triazol)), 140.47 (C-3(furanon)), 131.05 (C-3), 129.91 (C-2), 127.72 (C-4(1,2,3-triazol)), 125.15 (C-4(furanon)), 102.13 (C-5(furanon)), 97.49 (C-2(furanon)), 94.61 (C-1), 87.91 (C-1), 71.46 (C-4), 70.98 (C-4), 65.25 (C-5), 65.13 (C-5), 29.41 (-CH₂-), 21.97 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 21.06 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 18.75 (C-6), 18.12 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_6$: m/z 404.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczono m/z 404.2.

4-(3,4-dichloro-5-hydrokso-1H-pirol-2(5H)-on-1-yl)metyleno)-1-(4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozylo)-1H-1,2,3-triazol (Ram38)

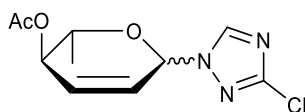
Otrzymano zgodnie z Procedurą 15 z azydku 4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozylowego (**Ram5**: 65.1 mg, 0.330 mmol) i 3,4-dichloro-5-hydrokso-1-propargilo-1H-pirol-2(5H)-onu (**Sub35**: 68.0 mg, 0.330 mmol). Otrzymano 83.9 mg **Ram38** z wydajnością 63%, w postaci żółtawego oleju, jako anomer β . $\alpha^23_{\text{D}} = -48$ ($c = 0.25$, CHCl_3).



¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.74 (s, 1H, H-5(triazol)), 6.60 (dd, $J=2.4$ Hz, 6.0 Hz, 1H, H-5(piról)) 5.46-5.44 (m, 2H, H-3, H-2), 5.30-5.33 (m, 1H, H-1), 5.13-5.16 (m, 1H, H-4), 4.58-4.68 (m, 2H, -CH₂-), 4.13-4.18 (m, 1H, H-5), 2.11 (s, 3H, OAc), 1.30 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-6); **¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃):** δ 169.92 (COCH₃), 162.81 (C-2(piról)), 148.76 (C-4(1,2,3-triazol)), 144.33 (C-5(1,2,3-triazol)), 137.97 (C-4(piról)), 129.14 (C-3), 128.22 (C-2), 125.30 (C-3(piról)), 94.54 (C-1), 81.91 (C-5(piról)), 71.06 (C-4), 67.53 (C-5), 35.17 (-CH₂-), 20.62 (COCH₃), 17.03 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₅H₁₆Cl₂N₄O₅: m/z 425.0 [M+Na]⁺; wyznaczono m/z 425.4.

3-chloro-1-(4-O-acetylo-2,3,6-trideoxy-L-erythro-heks-2-enopiranozylo)-1H-1,2,4-triazol (Ram39)

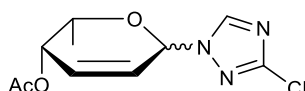
Otrzymano zgodnie z Procedurą 17. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 37.1 mg, 0.173 mmol) oraz 3-chloro-1H-1,2,4-triazol (**Sub40**: 17.9 mg, 0.173 mmol). Otrzymano 25.4 mg **Ram39** z wydajnością 82%, w postaci żółtego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:1$.



¹H NMR (400 MHz, CHCl₃): δ 8.12 (s, 1H, H-5(triazol)), 5.97 (d, 1H, $J=4.0$ Hz, H-1), 5.55 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, H-1), 5.24-5.29 (m, 4H, H-2, H-3), 4.55-4.63 (m, 2H, H-4), 4.09 (dq, 1H, $J=6.0$ Hz, 8.8 Hz, H-5), 3.92 (dq, 1H, $J=6.4$ Hz, 9.2 Hz, H-5), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 1.28 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, H-6), 1.20 (d, 3H, $J=6.0$ Hz, H-6); **¹³C NMR (100 MHz, CHCl₃):** δ 169.84 (COCH₃), 169.15 (COCH₃), 152.44 (C-5(triazol)), 139.64 (C-3(triazol)), 130.66 (C-3), 128.37 (C-2), 84.49 (C-1), 80.16 (C-1), 74.67 (C-5), 71.82 (C-5), 71.43 (C-4), 70.63 (C-4), 21.48 (COCH₃), 20.81 (COCH₃), 18.28 (C-6), 17.25 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₀H₁₂ClN₃O₃: m/z 280.0 [M+Na]⁺; wyznaczone m/z 279.5.

3-chloro-1-(4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-treo-heks-2-enopiranozylo)-1H-1,2,4-triazol
(Fuk22)

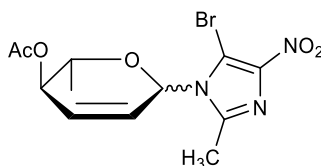
Otrzymano zgodnie z Procedurą 17. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-fukal (**Fuk3**: 35.3 mg, 0.165 mmol) oraz 3-chloro-1H-1,2,4-triazol (**Sub40**: 17.1 mg, 0.165 mmol). Otrzymano 21.7 mg **Fuk22** z wydajnością 51%, w postaci żółtego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:1$.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CHCl_3): δ 8.15 (s, 1H, H-5(triazol)), 6.07 (d, 1H, $J=3.6$ Hz, H-1 α), 5.95 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, H-1 β), 5.54-5.62 (m, 4H, H-2 α , H-2 β , H-3 α , H-3 β), 4.76-4.83 (m, 2H, H-4 α , H-4 β), 4.26 (q, 1H, $J=6.0$ Hz, H-5), 3.96 (q, 1H, $J=6.4$ Hz, H-5), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.22 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6), 1.18 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CHCl_3): δ 170.28 (C=OCH_3), 169.84 (C=OCH_3), 152.49 (C-5(triazol)), 149.82 (C-3(triazol)), 130.43 (C-3), 130.02 (C-3), 128.72 (C-2), 127.18 (C-2), 97.77 (C-1), 92.16 (C-1), 71.56 (C-4), 70.49 (C-4), 69.51 (C-5), 68.16 (C-5), 21.48 (COCH_3), 20.81 (COCH_3), 18.28 (C-6), 17.25 (C-6); **MS(ESI)**: obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_3$: m/z 458.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; wyznaczone m/z 458.1.

5-bromo-2-metylo-4-nitro-1-(4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozylo)-1H-imidazol (**Ram40**)

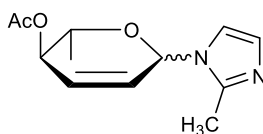
Otrzymano zgodnie z Procedurą 17. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 39.9 mg, 0.186 mmol) oraz 5-bromo-2-metylo-4-nitro-1H-imidazol (**Sub41**: 38.4 mg, 0.186 mmol). Otrzymano 38.2 mg **Ram40** z wydajnością 87%, w postaci żółtego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:1$.



¹H NMR (400 MHz, CHCl₃): δ 5.87 (d, 1H, *J*=4.4 Hz, H-1), 5.68 (d, 1H, *J*=8.8 Hz, H-1), 5.32-5.37 (m, 4H, H-2, H-3), 4.47-4.52 (m, 2H, H-4), 4.11-4.15 (m, 1H, H-5), 3.91 (dq, 1H, *J*=6.0 Hz, 9.6 Hz, H-5), 2.83 (s, 2H, -CH₃), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 1.25 (d, 3H, *J*=6.4 Hz, H-6), 1.21 (d, 3H, *J*=6.0 Hz, H-6); **¹³C NMR (100 MHz, CHCl₃):** δ 170.55 (C=O), 169.97 (C=O), 144.83 (C-4(imidazol)), 143.2 (C-2(imidazol)), 130.74 (C-3), 129.13 (C-2), 112.10 (C-5(imidazol)), 87.19 (C-1), 80.85 (C-1), 74.17 (C-5), 71.87 (C-5), 71.45 (C-4), 70.75 (C-4), 21.56 (COCH₃), 20.62 (COCH₃), 18.92 (C-6), 17.37 (C-6) 14.51 (-CH₃); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₂H₁₄BrN₃O₅: *m/z* 360.0 [M+H]⁺; wyznaczone *m/z* 360.3.

2-metylo-1-(4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozylo)-1H-imidazol
(Ram41)

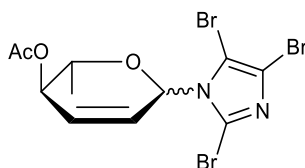
Otrzymano zgodnie z Procedurą 17. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 35.7 mg, 0.167 mmol) oraz 2-metyloimidazol (**Sub42**: 13.7 mg, 0.167 mmol). Otrzymano 22.4 mg **Ram41** z wydajnością 42%, w postaci żółtego oleju, jako mieszaninę anomerów α:β = 1:1.



¹H NMR (400 MHz, CHCl₃): δ 7.76 (s, 1H, H-5(imidazol)), 7.08 (s, 1H, H-4(imidazol)), 5.72 (d, 1H, *J*=4.0 Hz, H-1), 5.35 (d, 1H, *J*=7.2 Hz, H-1), 5.06-5.17 (m, 4H, H-2, H-3), 4.36-4.41 (m, 2H, H-4), 4.21 (dq, 1H, *J*=6.0 Hz, 9.2 Hz, H-5), 3.85 (dq, 1H, *J*=6.4 Hz, 9.2 Hz, H-5), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 1.26 (d, 3H, *J*=6.0 Hz, H-6), 1.21 (d, 3H, *J*=6.4 Hz, H-6); **¹³C NMR (100 MHz, CHCl₃):** δ 176.15 (C-2(imidazol)), 170.17 (C=O), 169.71 (C=O), 133.31 (C-4(imidazol)), 131.17 (C-3), 128.70 (C-2), 119.84 (C-5(imidazol)), 85.42 (C-1), 79.16 (C-1), 73.41 (C-5), 71.83 (C-5), 71.45 (C-4), 70.89 (C-4), 20.83 (COCH₃), 20.17 (COCH₃), 18.49 (C-6), 17.36 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₂H₁₆N₂O₃: *m/z* 259.1 [M+Na]⁺; wyznaczone *m/z* 259.3.

2,4,5-tribromo-1-(4-O-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erythro-heks-2-enopiranozyl)-1H-imidazol (Ram42)

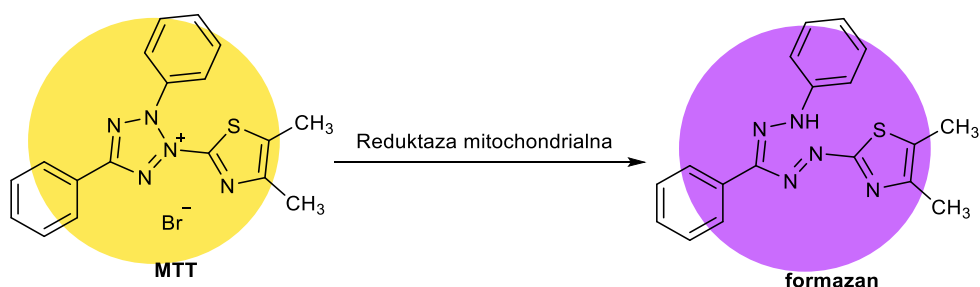
Otrzymano zgodnie z Procedurą 17. Do reakcji użyto 3,4-di-O-acetylo-L-ramnal (**Ram3**: 38.1 mg, 0.178 mmol) oraz 2,4,5-tribromo-1H-imidazol (**Sub43**: 54.2 mg, 0.178 mmol). Otrzymano 28.6 mg **Ram42** z wydajnością 35%, w postaci żółtego oleju, jako mieszaninę anomerów $\alpha:\beta = 1:1$.



¹H NMR (400 MHz, CHCl₃): δ 5.75 (d, 1H, $J=3.6$ Hz, H-1), 5.46-5.51 (m, 5H, H-1, H-2, H-3), 4.55-4.60 (m, 2H, H-4), 4.02-4.06 (m, 1H, H-5), 3.89 (dq, 1H, $J=6.4$ Hz, 9.6 Hz, H-5), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 1.28 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6), 1.24 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, H-6); **¹³C NMR (100 MHz, CHCl₃):** δ 170.68 (COCH₃), 169.74 (COCH₃), 130.27 (C-3), 129.83 (C-2), 128.94 (C-1(triazol)), 124.18 (C-4(triazol)), 105.81 (C-2(triazol)), 86.51 (C-1), 80.47 (C-1), 73.69 (C-5), 71.84 (C-5), 71.82 (C-4), 70.57 (C-4), 21.18 (COCH₃), 20.47 (COCH₃), 18.36 (C-6), 17.74 (C-6); **MS(ESI):** obliczone dla C₁₁H₁₁Br₃N₂O₃: m/z 456.8 [M+H]⁺; wyznaczone m/z 457.2.

5. WSTĘPNA OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ

W kolejnym etapie pracy wykonano oznaczenia aktywności biologicznej otrzymanych pochodnych cukrowych, zaprojektowanych jako inhibitory α -1,6-fukozylotransferazy. Badania przeprowadzono we współpracy z dr hab. Magdaleną Skonieczną, prof. PŚ w Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej. W pierwszym etapie badań oznaczono aktywność cytotoksyczną otrzymanych związków za pomocą testu MTT w odniesieniu do modelowych linii komórek nowotworowych (HCT116 i MCF-7). Test ten służy do oceny aktywności metabolicznej komórek, w którym wykorzystuje się odczynnik MTT, tj. sól tetrazoliową, bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy. Wykorzystuje on aktywność enzymu mitochondrialnego – dehydrogenazy bursztynianowej. Po przejściu przez błonę komórkową aktywnych metabolicznie komórek, w wyniku działania enzymu, następuje redukcja rozpuszczalnego w wodzie żółto-pomarańczowego odczynnika MTT do fioletowych, nierozpuszczalnych w wodzie kryształków formazanu. Badanie to zwykle wykonywane jest po kilku godzinach inkubacji komórek z MTT. Wytworzony formazan jest następnie rozpuszczany w DMSO lub izopropanolu, po czym za pomocą spektrofotometru przy długości fali 570 nm mierzy się absorbancję barwnego roztworu (**Schemat 37**) [125]. Ilość powstałego formazanu jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. W komórkach uszkodzonych lub martwych wytwarzanie formazanu jest zmniejszone lub całkowicie zahamowane.



Schemat 37. Redukcja soli MTT do nierozpuszczalnego formazanu (na podstawie [126]).

W kolejnym etapie badań w ramach współpracy z dr inż. Radosławem Kitlem z Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, przeprowadzono test przesunięcia

temperatury topnienia białka NodZ (TSA, z ang. *Thermal Shift Assay*), mający na celu selekcję związków, które mogą wiązać się z fukozylotransferazą 8. Testy TSA wykorzystują barwnik fluorescencyjny (np. SYPRO Orange), w celu określenia temperatury topnienia białka (T_m). W wyniku wiązania z ligandem dochodzi do stabilizacji konformacyjnej białek, powodującej wzrost T_m [127]. Test ten nie pozwala jednak na ustalenie stałej dysocjacji K_d , która mówi o sile wiązania białko-ligand, jedynie o obecności potencjalnego wiązania.

W ostatniej części badań biologicznych, we współpracy z dr inż. Katarzyną Papaj z Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej, określono oddziaływanie wybranych pochodnych z bakteryjną α -1,6-fukozylotransferazą NodZ, pochodzącą z *Bradyrhizobium japonicum* (otrzymaną we współpracy z dr inż. Radosławem Kitlem). Do oceny oddziaływań wykorzystano zjawisko termoforezy mikroskalowej MST. Badania przeprowadzono na pochodnych, dla których zaobserwowano zmiany w termostabilności białka w teście TSA. Technika MST służy do ilościowej oceny oddziaływań biomolekularnych, dając informację o sile wiązania otrzymanych struktur z białkiem receptorowym. Metoda ta opiera się na termoforezie, czyli ukierunkowanym ruchu cząsteczek w gradiencie temperatury, który zależy od różnych właściwości cząsteczek, takich jak rozmiar, ładunek, powłoka hydratacyjna czy konformacja. Oznacza to, że technika ta jest bardzo czuła na niemal każdą zmianę właściwości molekularnych, dzięki czemu możliwa jest precyzyjna kwantyfikacja zdarzeń molekularnych niezależnie od wielkości czy charakteru badanej próbki [128]. Podczas eksperymentu MST, gradient temperatury jest indukowany przez laser IR. Ukierunkowany ruch cząsteczek wywołany gradientem temperatury jest wykrywany i określany ilościowo przy użyciu kowalencyjnie przyłączonych lub wewnętrznych fluoroforów (znaczników), pozwalając na określenie wartości stałej dysocjacji (K_d) [128].

5.1. Badania przeciwnowotworowe pochodnych furan-2(5H)-onu i 2H-pirol-2-onu

5.1.1. Cytotoksyczność badanych pochodnych

Cytotoksyczność badanych pochodnych oznaczono *in vitro*, na liniach nowotworowych HCT116 (ludzki rak jelita grubego) oraz MCF-7 (ludzki rak piersi) za pomocą testu MTT, w którym komórki inkubowano z badanymi związkami przez 72 godziny (hodowle prowadzono w standardowych warunkach hodowlanych, tj. 37°C, 5% CO₂ i 80% wilgotności, w pożywce hodowlanej DMEM-F12, którą wzbogacono surowicą bydlęcą, 10% FBS i antybiotykami, penicylina i streptomycyna (Sigma Aldrich)). Badanie prowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach, a przeżywalność komórek przedstawiono za pomocą wartości IC₅₀. Parametr ten określa stężenie związku, który powoduje zredukowanie populacji komórek o 50% w odniesieniu do nietraktowanej kontroli. Otrzymane wyniki zebrano w **tabeli 8**.

Tabela 8. Obliczone wartości IC₅₀ dla linii komórkowych HCT116 oraz MCF-7 po 72-godzinnej inkubacji z badanymi związkami (średnia wartość w z 3 powtórzeń ± SD).

Nr struktury	IC ₅₀ (μM)	
	HCT116	MCF-7
Ram31	Brak efektu*	29.9±0.1
Ram32	14.6±3.7	Brak efektu*
Ram33	166.4±0.7	212.1±1.0
Ram34	39.2±17.8	11.9±0.02
Glu11	19.2±3.3	19.7±8.8
Glu12	Brak efektu*	258.9±2.2
Fuk20	31.4±6.4	Brak efektu*
Fuk21	70.4±10.8	Brak efektu*

Ram35	14.3±1.3	35.6±0.03
Ram36	Brak efektu*	Brak efektu*
Ram37	14.0±0.2	19.0±0.9
Ram38	9.2±0.6	17.0±1.0
Sub32 (MCA)	8.3±1.1	32.3±4.4

Analizując zależność pomiędzy strukturą związku a jego aktywnością wobec badanych nowotworowych linii komórkowych, zaobserwowano wzrost cytotoxycywności, w przypadku, gdy cząsteczka zawierała 2,3-nienasyconą resztę cukrową (**Ram31**, **Ram32**, **Ram37** i **Ram38**). Najslabszy efekt zaobserwowano dla pochodnych zawierających w swojej strukturze resztę L-fukozy (**Fuk20** i **Fuk21**). Dalsze porównanie otrzymanych pochodnych pozwoliło na stwierdzenie, że zamiana w cząsteczce reszty furan-2(5*H*)-onu na 2*H*-pirol-2-on miały pomijalny wpływ na poprawę właściwości cytotoxycywnych badanych pochodnych. Również odległość od pierścienia furan-2(5*H*)-onu lub 2*H*-pirol-2-onu nie miała istotnego znaczenia dla poprawy aktywności cytotoxycywnych związków.

5.1.2. Hamowanie cyklu komórkowego i działanie proapoptotyczne

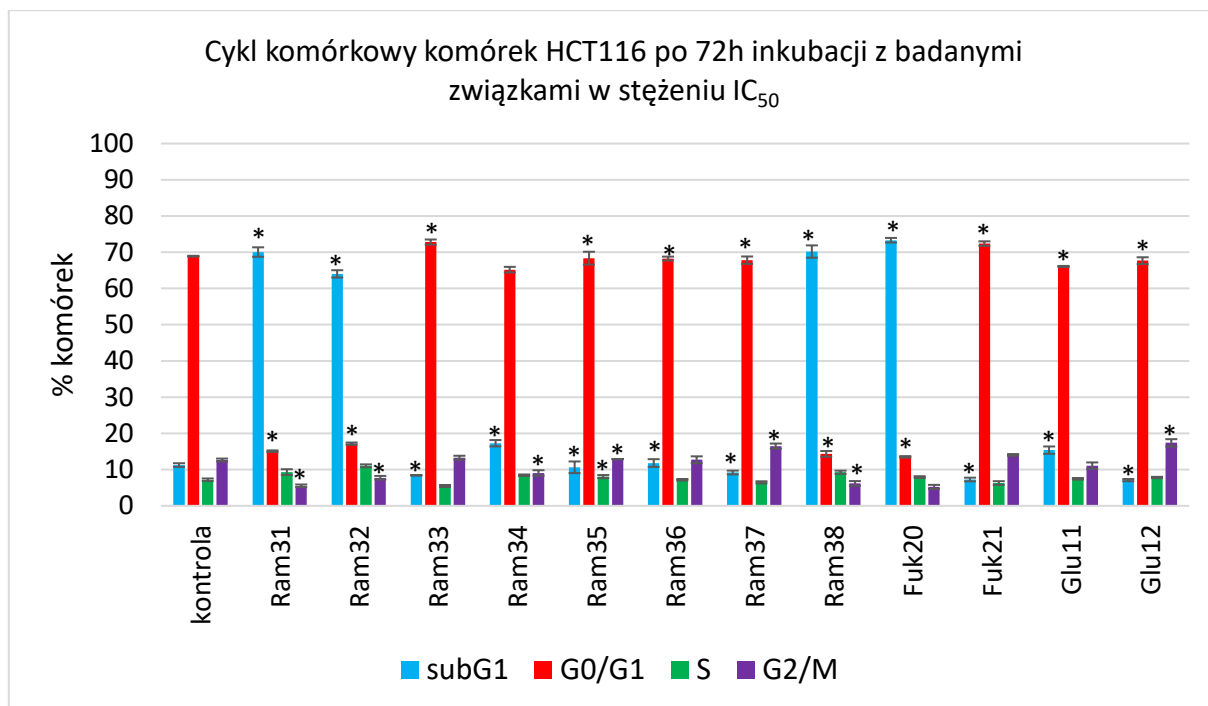
Aktywność przeciwnowotworowa związków może wynikać z różnych mechanizmów ich działania. Związki te mogą hamować cykl komórkowy (działanie cytostatyczne), indukować apoptozę lub nekrozę. W celu rozpoznania typu mechanizmu działania badanych pochodnych w komórkach nowotworowych zastosowano analizę cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Pomiar ten jest możliwy ze względu na fakt, że ilość DNA w komórkach jest zmienna i zależna od pojedynczego etapu cyklu. Barwienie DNA specyficznymi barwnikami jądrowymi, takimi jak jodek propidyny (PI), pozwala na stosunkowo łatwe policzenie i rozróżnienie komórek o różnej zawartości DNA w jądrze. Stosując cytometrię przepływową i odpowiednie bramkowanie analityczne można na tej podstawie dopasować fazy cyklu komórkowego: faza subG1 (komórki apoptotyczne i nekrotyczne); faza G0/G1 (komórki diploidalne 2*n*; zwane też jednojądrowymi); faza S (replikacja z syntezą DNA; zawartość

DNA większa niż $2n$); faza G2/M (komórki tetraploidalne $4n$; ze zdwojoną zawartością DNA w jądrze). Dodatkowo obecne komórki z zaburzoną i niekontrolowaną replikacją oraz uszkodzoną mitozą reprezentują frakcję poliploidalną (zawartość DNA powyżej $4n$).

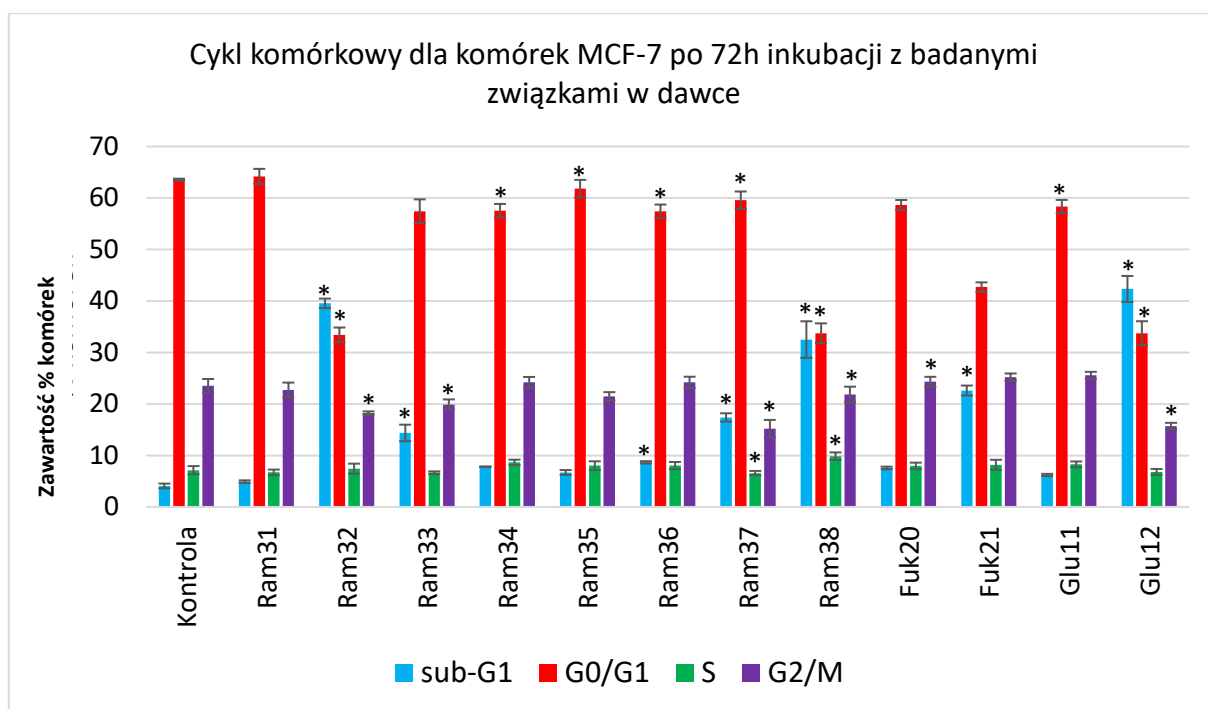
Uzyskane wyniki analizy cyklu komórkowego potwierdziły działanie cytotoksyczne większości badanych pochodnych (**rysunek 5 i 6**), jednak ich rozbieżność przy porównaniu obu linii komórkowych może wskazywać na tkankowo-zależne efekty. Na podstawie wykresów zarówno dla linii komórkowej HCT116, jak i MCF-7 zaobserwowano wpływ na podwyższenie fazy subG1, w porównaniu do kontroli (**rysunek 5 i 6**). Wzrost fazy subG1 może wskazywać na aktywację programowanej śmierci komórkowej, czyli apoptozy i/lub niekontrolowanej i szybkiej nekrozy. Taki kierunek działania potwierdza potencjalnie proapoptotyczny efekt badanych związków wobec nowotworowej linii komórkowej HCT116 po dodaniu odpowiednio **Ram31, Ram32, Ram37, Ram38, Ram35** (**rysunek 5**) oraz wobec komórek MCF-7 po dodaniu **Ram32, Glu12, Ram36, Ram37, Ram38** (**rysunek 6**).

Dla linii komórkowej HCT116 zaobserwowano natomiast nieznaczny wzrost liczby komórek w fazie G0/G1 dla związków **Ram33, Ram34, Glu11, Glu12, Fuk20, Fuk21** i **Ram36**, co może wskazywać na blokadę cyklu komórkowego, prawdopodobnie z powodu zaburzenia punktów kontrolnych cyklu komórkowego (**rysunek 5**). W dalszej analizie badanych związków nie zaobserwowano wzrostu komórek w fazach G0/G1 i S.

Dla linii komórkowej HCT116 zaobserwowano natomiast nieznaczny wzrost liczby komórek w fazie G0/G1 dla związków **Ram33, Ram34, Glu11, Glu12, Fuk20, Fuk21** i **Ram36**, co może wskazywać na blokadę cyklu komórkowego, prawdopodobnie z powodu zaburzenia punktów kontrolnych cyklu komórkowego (**rysunek 5**). W dalszej analizie badanych związków nie zaobserwowano wzrostu komórek w fazach G0/G1 i S (**rysunek 5**).



Rysunek 5. Cykl komórkowy dla komórek HCT116 po 72h inkubacji z badanymi związkami w dawce IC₅₀ (lub dla związków nieskutecznych w stężeniu 100 μM), na podstawie **tabeli 8**. Frakcja subG1 reprezentuje komórki apoptotyczne i martwe. Wyniki przedstawiono jako średnie z 3 eksperymentów ± SD. Istotność statystyczną oznaczono gwiazdką, ocenioną za pomocą testu T, gdzie $p < 0.05$.



Rysunek 6. Cykl komórkowy dla komórek MCF-7 po 72h inkubacji z badanymi związkami w dawce IC_{50} (lub dla związków nieskutecznych w stężeniu $100 \mu M$), na podstawie tabeli 8. Frakcja subG1 reprezentuje komórki apoptotyczne i martwe. Wyniki przedstawiono jako średnie z 3 eksperymentów \pm SD. Istotność statystyczną oznaczono gwiazdką, ocenioną za pomocą testu T, gdzie $p < 0.05$.

Uzyskane wyniki dotyczące rozkładu faz cyklu komórkowego w komórkach MCF-7, po 72 godzinach traktowania wskazywały zauważalny wzrost liczby komórek apoptotycznych we frakcji subG1, a następnie niewielki ich przyrost tylko w przypadku kilku związków, co potwierdziło badanie cytotoksyczności (rysunek 6). Wzrost frakcji subG1 nastąpił po dodaniu **Ram32**, **Ram33**, **Glu12**, **Fuk21**, **Ram36**, **Ram37** i **Ram38** (rysunek 6), jednak efekty dla linii komórkowej MCF-7 nie były aż tak spektakularne jak dla linii HCT116. Obniżenie frakcji G0/G1 w większości eksperymentów na komórkach MCF-7 było raczej wynikiem powstawania frakcji apoptotycznej niż cytostatycznej blokady cyklu komórkowego.

Podsumowując, uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały, że badane związki powodowały istotny spadek żywotności komórek linii komórkowych HCT116 i MCF-7. Porównując wyniki dla wybranych linii komórkowych można zauważyć, że wartości IC_{50} dla linii komórkowej MCF-7 są znacznie wyższe lub w ogóle nie wykazują aktywności,

w odróżnieniu od linii komórkowej HCT116, co wskazuje, że estrogenozależne komórki raka piersi są znacznie mniej wrażliwe na badane pochodne.

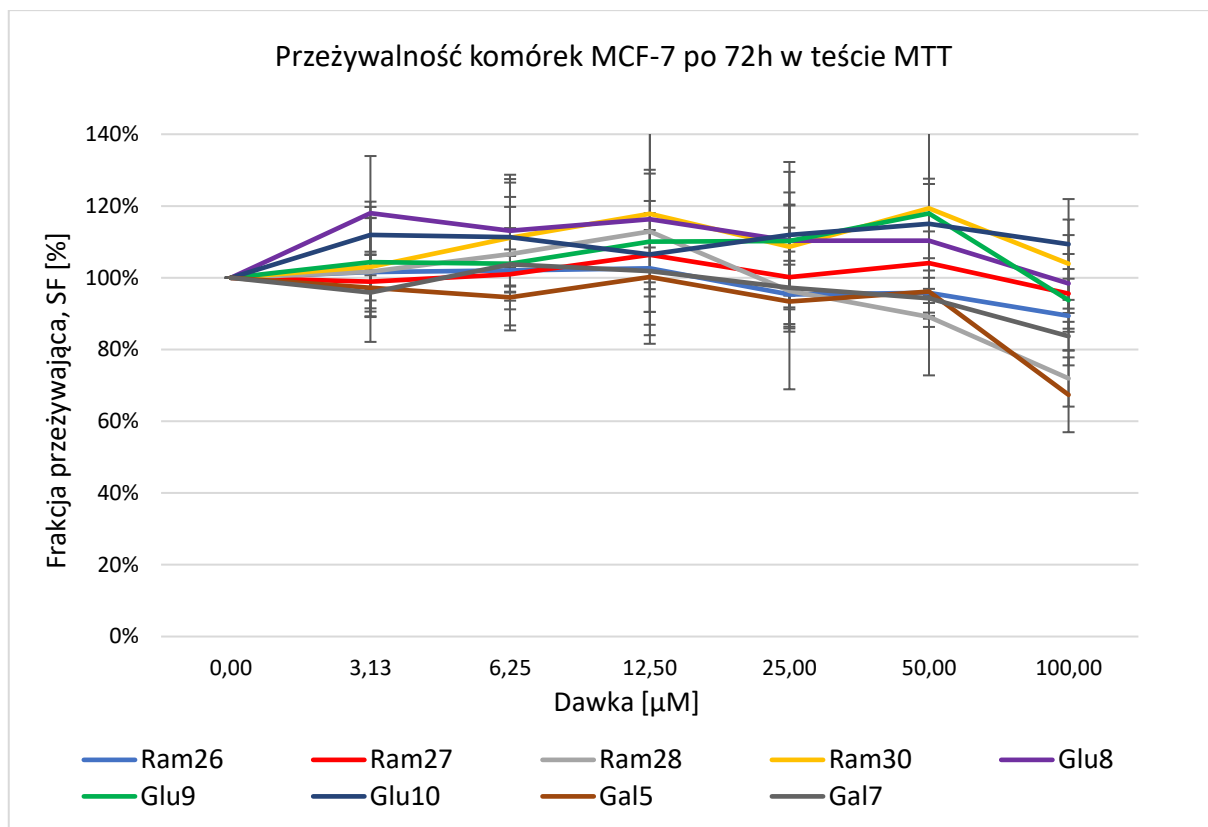
Analizując struktury badanych związków pod kątem reszty cukrowej, wśród pochodnych 3,4-dichloro-furan-2(5*H*)-onu najbardziej cytotoksycznym związkiem była pochodna glukozy, natomiast wśród pochodnych 2*H*-pirol-2-onu najbardziej cytotoksyczną okazała się pochodna 4-*O*-acetylo-2,3,6-trideoksy-L-erytro-heks-2-enopiranozy. Różnice te mogą wynikać z interakcji z innymi celami molekularnymi w komórce. Zaobserwowano również, że zwiększenie odległości jednostki cukrowej od pierścienia 1,2,3-triazolowego powoduje zmniejszenie wartości IC₅₀ badanych związków.

Przeprowadzone badania dostarczają wstępnej oceny aktywności przeciwnowotworowej pochodnych furan-2(5*H*)-onu i 2*H*-pirol-2-onu i stanowią punkt wyjścia do dalszych badań ukierunkowanych na optymalizację struktury i określenie celu molekularnego.

5.2. Badania przeciwnowotworowe pochodnych tiadiazoli

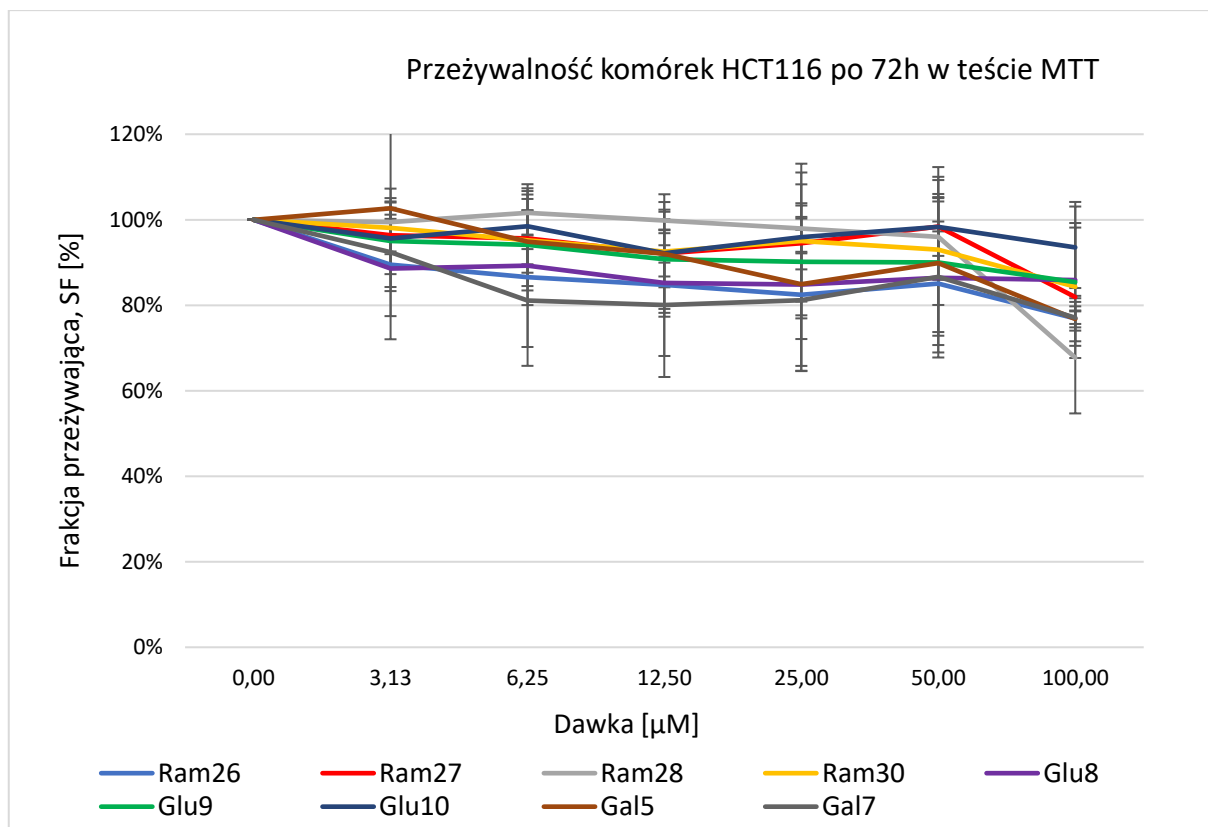
5.2.1. Cytotoksyczność badanych pochodnych

Wpływ pochodnych z tej grupy na nowotworowe linie komórkowe HCT116 i MCF-7 określono za pomocą testu MTT. Po 72-godzinnej inkubacji z badanymi związkami zmierzono przeżywalność komórek i przedstawiono ją jako frakcję przeżywającą (SF) na **rysunkach 7 i 8**.



Rysunek 7. Przeżywalność komórek MCF-7 po 72h inkubacji z różnymi dawkami badanych związków (0-100 μM). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z 3 eksperymentów \pm SD.

Wyniki z testu MTT dla komórek MCF-7 nie pozwoliły na obliczenie IC_{50} . Jednak w przypadku dwóch związków (**Ram28** i **Gal5**) SF komórek zmniejszyła się znacząco przy zastosowaniu najwyższych dawek (**rysunek 7**).

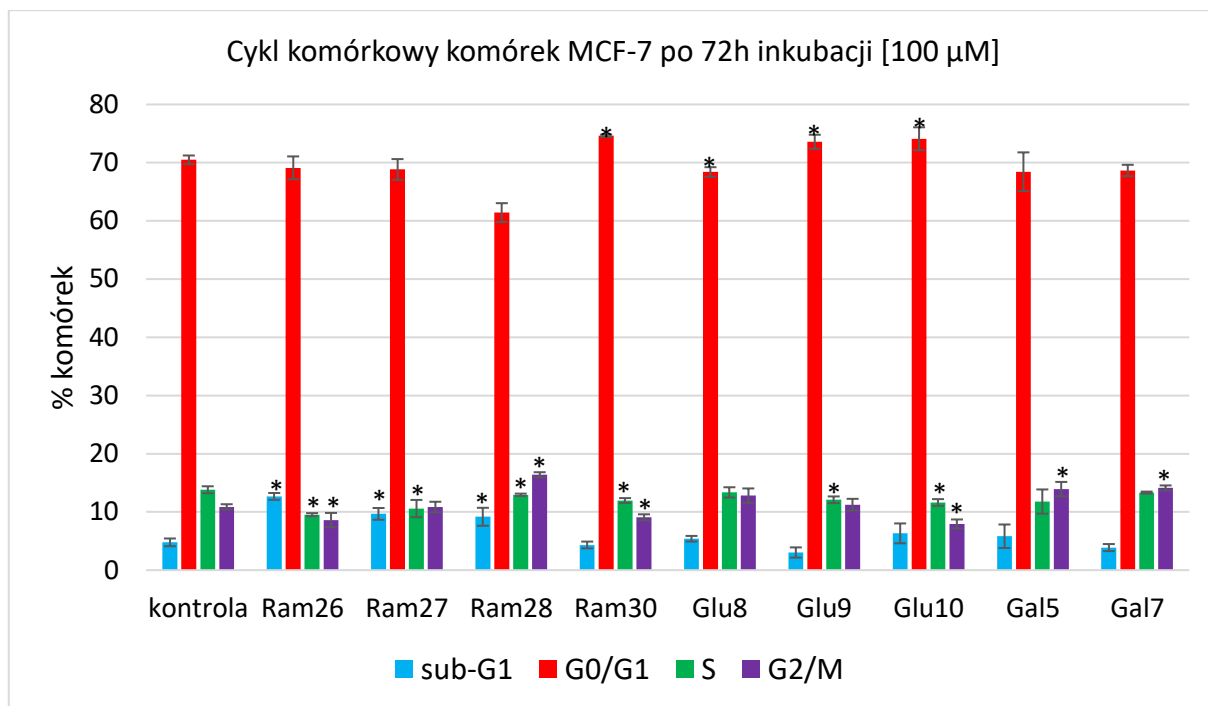


Rysunek 8. Przeżywalność komórek HCT116 po 72h inkubacji z różnymi dawkami badanych związków (0-100 μM). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z 3 eksperymentów \pm SD.

Analizując wyniki uzyskane dla linii komórkowej HCT116 stwierdzono, że ta linia komórkowa była bardziej wrażliwa na badane związki niż linia komórkowa MCF-7, co można zaobserwować na **rysunku 8**.

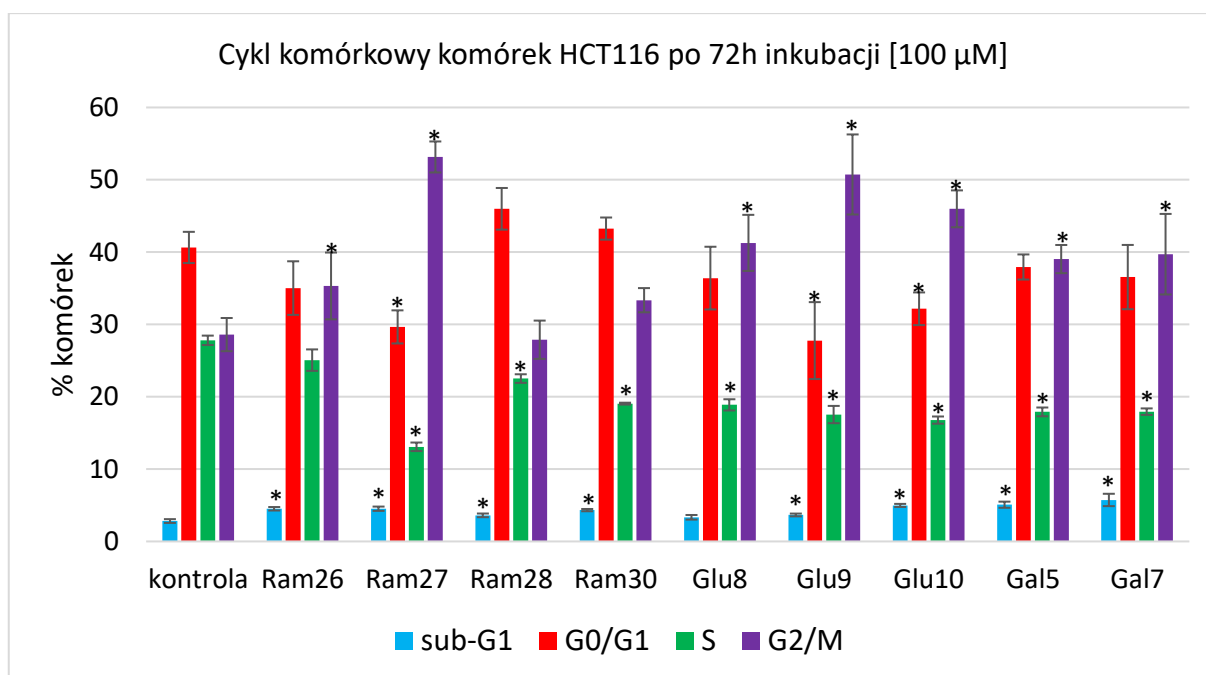
5.2.2. Efekty cytostatyczne na liniach komórek nowotworowych, po których następuje cykl komórkowy

Mimo że test MTT nie dostarczył jednoznacznych wyników dotyczących cytotoksyczności badanych związków, efekt obniżonej żywotności mógł być spowodowany zatrzymaniem cyklu komórkowego (**Rysunek 9**). Dla lepszej interpretacji możliwych efektów postanowiono wykonać analizę cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej dla najwyższych dawek związków (100 μM).



Rysunek 9. Cykl komórkowy dla komórek MCF-7 po 72h inkubacji ze związkami o stężeniu 100 μ M. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm SD. Analizę statystyczną oparto o test T, a wartość p mniejszą niż 0.05 uznawano za statystycznie istotną w porównaniu do nietraktowanych kontroli (oznaczonych gwiazdką).

W przypadku komórek MCF-7, niektóre z badanych związków (**Ram26** i **Ram28**) wpłynęły na cykl komórkowy i zwiększyły liczbę komórek w fazie sub-G1 (komórki martwe) (**rysunek 9**). Ponadto zaobserwowano widoczne zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 po inkubacji komórek ze związkami **Glu8**, **Glu9** i **Glu10**.



Rysunek 10. Cykl komórkowy w komórkach HCT116 po 72h inkubacji ze związkami o stężeniu 100 μ M. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm SD. Analizę statystyczną oparto o test T, a wartość p mniejszą niż 0.05 uznawano za statystycznie istotną w porównaniu do kontroli **Tabela 9**.

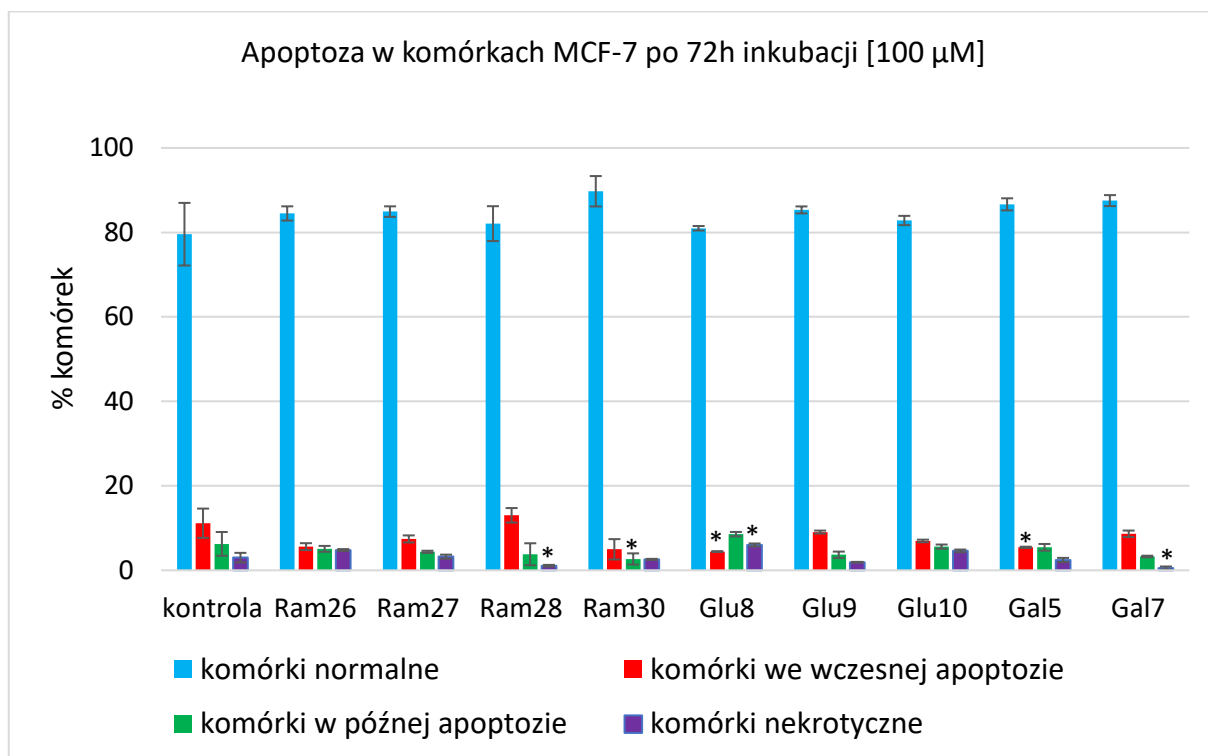
Inkubacja z komórkami linii HCT116 dała bardziej widoczne efekty cytostatyczne i cytotoksyczne (**Rysunek 10**). Zastosowanie związków **Ram26**, **Ram27**, **Ram28** i **Ram30** spowodowało wzrost liczby komórek w fazie sub-G1. Dodatkowo obniżenie liczby komórek w fazie S oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M wskazywało na uszkodzenie DNA z zahamowaniem procesu replikacji.

Na podstawie otrzymanych wyników postanowiono dodatkowo zbadać rodzaj śmierci komórkowej dla badanych linii komórkowych za pomocą testu aneksyny V, który pozwala odróżnić nekrozę od apoptozy.

5.2.3. Mechanizm śmierci indukowany w liniach nowotworowych

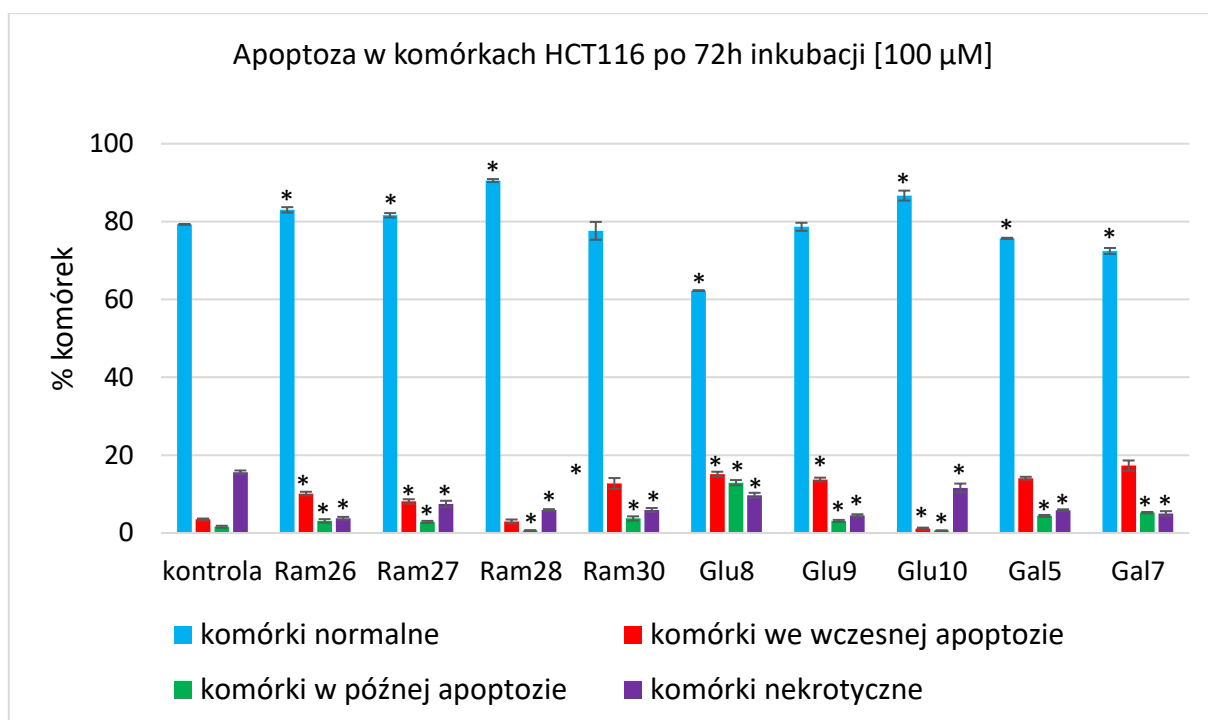
W celu określenia mechanizmu śmierci komórek wykonano oznaczenie podwójnego barwienia aneksyną-V (2.5 μ M) z jodkiem propidyny (w stężeniu 100 μ g/mL) po 72-godzinnej inkubacji w warunkach standardowych (opisane dla testu

MTT w podrozdziale 5.1.1) obu linii komórkowych z analizowanymi związkami w stężeniu 100 μ M.



Rysunek 11. Apoptoza w komórkach MCF-7 po 72h inkubacji ze związkami o stężeniu 100 μ M. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm SD. Analizę statystyczną oparto o test T, a wartość p mniejszą niż 0.05 uznawano za statystycznie istotną w porównaniu do nietraktowanych kontroli (oznaczonych gwiazdką).

Na podstawie uzyskanych wyników, dla linii komórkowej MCF-7 (**rysunek 11**), stwierdzono, że badane związki nie wykazywały działania proapoptotycznego.



Rysunek 12. Apoptoza w HCT116 po 72h inkubacji ze związkami o stężeniu 100 μ M. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm SD. Analizę statystyczną oparto o test T, a wartość p mniejszą niż 0.05 uznawano za statystycznie istotną w porównaniu do nietraktowanych kontroli (oznaczone gwiazdką).

W przeciwieństwie do MCF-7, komórki HCT116 (**rysunek 12**) odpowiedziały apoptozą. Wskazało to, że analizowane związki wykazują aktywność proapoptotyczną wobec tej linii komórkowej.

Podsumowując, w oparciu o test MTT uzupełniony o analizę cytometrii przepływową określono aktywność biologiczną badanych związków. Połączenie tych metod pozwoliło na wykrycie cytotoksycznego, cytostatycznego i letalnego działania związków na analizowane/testowane linie komórkowe.

Tabela 9. Porównanie działania cytotoksycznego pochodnych **Ram26-Ram28, Ram30, Glu8-Glu10, Gal5 i Gal7** wobec linii komórkowych MCF-7 i HCT116.

Związek	MCF-7			HCT116		
	MTT (100 μ M)	Komórki w fazie sub-G1	Komórki wczesno-apoptotyczne	MTT (100 μ M)	Komórki w fazie sub-G1	Komórki wczesno-apoptotyczne
Ram26	(-)	↑↑	↓	↓	↑	↑↑
Ram27	(-)	↑↑	↓	↓	↑	↑↑
Ram28	↓↓	↑↑	↑	↓↓	↑	(-)
Ram30	(-)	(-)	↓	↓	↑	↑
Glu8	(-)	↑	↓	↓	(-)	↑↑
Glu9	(-)	↓	↓	↓	(-)	↑↑
Glu10	(-)	↑	↓	(-)	↑	↓
Gal5	↓↓	↑	↓	↓	↑↑	↑↑
Gal7	↓	(-)	↓	↓	↑↑	↑↑

(-) – brak efektu; ↓ – spadek wartości SF; ↑ – wzrost liczby komórek w fazie sub-G1 w porównaniu z kontrolą; ↓ – spadek liczby komórek w fazie sub-G1 w porównaniu z kontrolą; ↑ – wzrost liczby komórek wczesno-apoptotycznych w porównaniu z kontrolą; ↓ – spadek liczby komórek wczesno-apoptotycznych w porównaniu z kontrolą. Liczba strzałek wskazuje na siłę efektu (pojedyncza: słaba, podwójna: silniejsza).

Wyniki testu MTT wskazały, że efekt działania związków zależał od badanej linii komórkowej (**Tabela 9**). Wykazano, że komórki MCF-7 były bardziej odporne na zastosowane związki, a komórki HCT116 były bardziej na nie wrażliwe. Niestety, związki wykazywały niską aktywność biologiczną, stąd nie można było ocenić ani parametru IC_{50} , ani selektywności związków wobec badanych linii komórkowych dla badanych dawek. Niemniej jednak, na podstawie wartości SF zaobserwowano, że najwyższe stężenia związków (100 μ M) hamowały proliferację komórek. Z tego powodu sprawdzono wpływ związków na cykl komórkowy jedynie dla najwyższych stężeń.

W przypadku komórek MCF-7, pomimo niskiego efektu cytotoksycznego związków, nie zaobserwowano żadnego efektu cytostatycznego ani proapoptotycznego. Podczas analizy cyklu komórkowego zaobserwowano niewielki wzrost liczby komórek w fazie sub-G1 lub wzrost komórek zatrzymanych w fazie G0/G1. Ponadto nie stwierdzono wzrostu liczby komórek apoptotycznych ani nekrotycznych. Niemniej jednak, wykryty efekt nie był znaczący w porównaniu z nietraktowaną kontrolą.

Bardziej obiecujące efekty zaobserwowano dla linii komórkowej HCT116, która odpowiedziała zarówno efektem cytostatycznym, jak i cytotoksycznym. Podczas analizy cyklu komórkowego zaobserwowano wzrost liczby komórek we frakcjach sub-G1, jednak najsilniejszy efekt widoczny był w zahamowaniu fazy S i zatrzymaniu komórek w fazie G2/M. Dodatkowo zaobserwowano wzrost komórek we wczesnej apoptozie, co sugeruje, że badane związki wykazują aktywność proapoptotyczną wobec linii komórkowej HCT116.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów zaobserwowano tkankozależne działanie badanych związków i stwierdzono, że wykazują one działanie cytotoksyczne na linii komórkowej MCF-7 i HCT116 oraz działanie cytostatyczne na linię komórkową HCT116.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane związki w obecnej formie nie mogą być wykorzystane jako leki przeciwnowotworowe, jednak stanowią obiecujące modele do dalszej modyfikacji. W celu poprawy aktywności przeciwnowotworowej koniugatów konieczne są modyfikacje strukturalne. Szczególnie interesujące jest zastosowanie w badaniach biologicznych koniugatów zdeprotegowanych, co powinno wpłynąć na poprawę rozpuszczalności tych pochodnych w stosowanym medium. Innym podejściem jest synteza pochodnych, w których cząsteczka cukru jest połączona z pochodną tiadiazolu poprzez linker alifatyczny, aromatyczno-alifatyczny lub aromatyczny.

5.3. Badania biologiczne z udziałem α -1,6-fukozylotransferazy

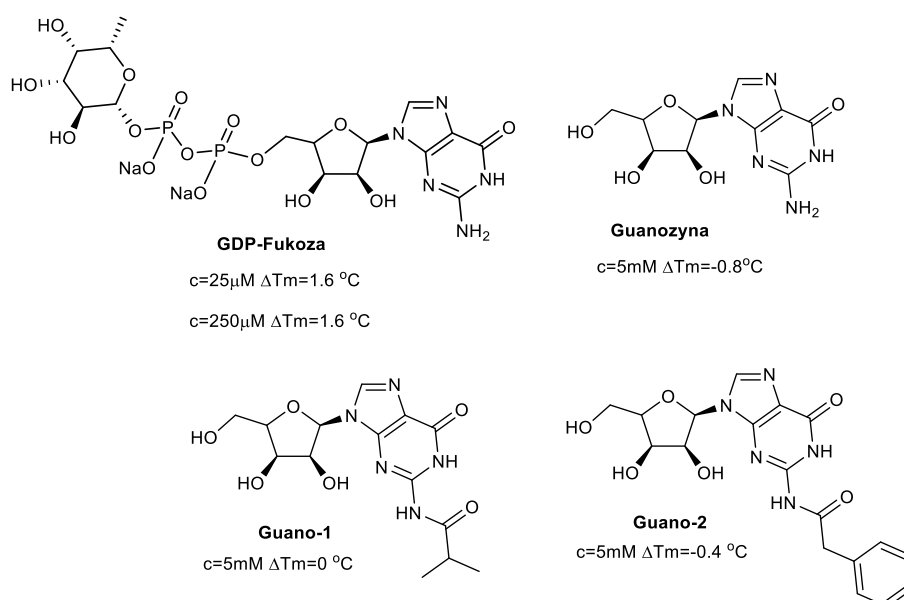
5.3.1. Thermal Shift Assay (TSA)

Test TSA przeprowadzono wykorzystując rekombinowane białko NodZ (FUT8), zgodnie z oryginalną procedurą opisaną przez zespół Niesen [¹²⁹]. Dla celów

przesiewowych zdecydowano się na przedstawienie danych jako pików topnienia z wykorzystaniem pierwszej pochodnej emisji fluorescencji w funkcji temperatury ($-dF/dT$), co pozwoliło na szybką identyfikację związków indukujących termiczną stabilizację białka.

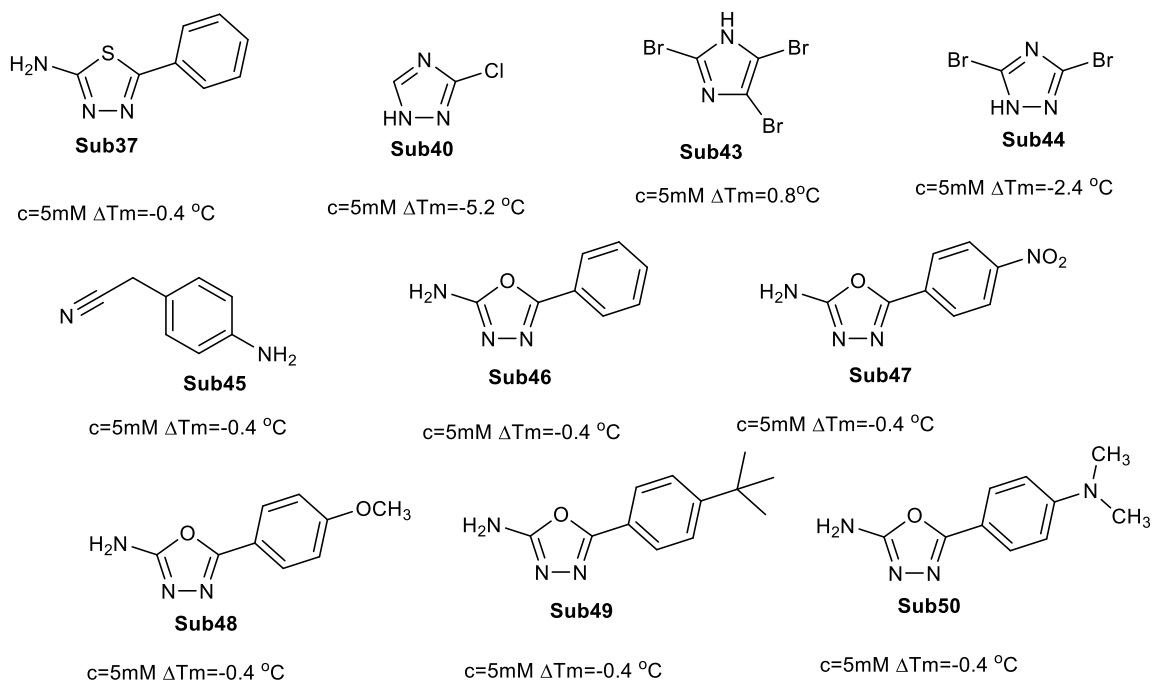
W pierwszej kolejności przeprowadzono eksperyment, w którym planowano sprawdzić czy uzyskane białko enzymatyczne będzie wiązać naturalny dla enzymu substrat. Stanowiłby on swoistą pozytywną kontrolę dla badanego białka. Przesunięcie T_m dla GDP-Fuc wskazało, że GDP-Fuc wiąże się z NodZ (**tabela 10**). Zgodnie z oczekiwaniami GDP-Fuc wiąże się z NodZ zmieniając jego termostabilność.

Następnie w celu określenia, czy możliwe jest obserwowanie zmian przesunięcia T_m wraz ze wzrostem stężenia ligandu, zbadano GDP-Fuc w stężeniu 25 i 250 μM . Jednak nawet tak duża różnica w stężeniach badanego związku nie spowodowała zmiany w przesunięciach pików. W tej serii eksperymentów zbadano również guanozynę o stężeniu 500 μM i okazało się, że również wiąże się ona z białkiem, przesuując pik topnienia w lewą stronę – destabilizując jego strukturę. Zbadano również dwie nowe pochodne guanozyny – N^2 -izobutyrylo-2'-deoksyguanozynę (**Guano-1**) i 2- N -fenyloacetyloguanozynę (**Guano-2**). Jedynie **Guano-2** dała widoczne przesunięcie ΔT_m , ale nie na tyle znaczące, aby uznać je za wiązanie (**schemat 38**).



Schemat 38. ΔT_m dla NodZ w obecności pochodnych guanozyny.

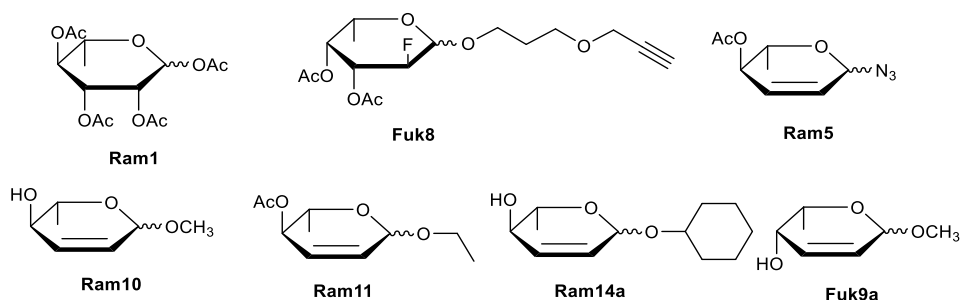
Drugą serią eksperymentów były eksperymenty dotyczące wiązania substratów niecukrowych. W ramach tej serii związków istotne przesunięcie ΔT_m wykazały pochodne **Sub40** (-5.2), **Sub44** (-2.4) i **Sub43** (0.8). Najsilniejszy efekt zaobserwowano dla **Sub40** z wartością $\Delta T_m = -5.2$ °C. Związki **Sub37**, **Sub45-Sub50** wykazały $\Delta T_m = -0.4$ °C. Wynik ten jest dosyć obiecujący, jednak ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność tych związków powinien być raczej uważany za artefakt (**schemat 39**).



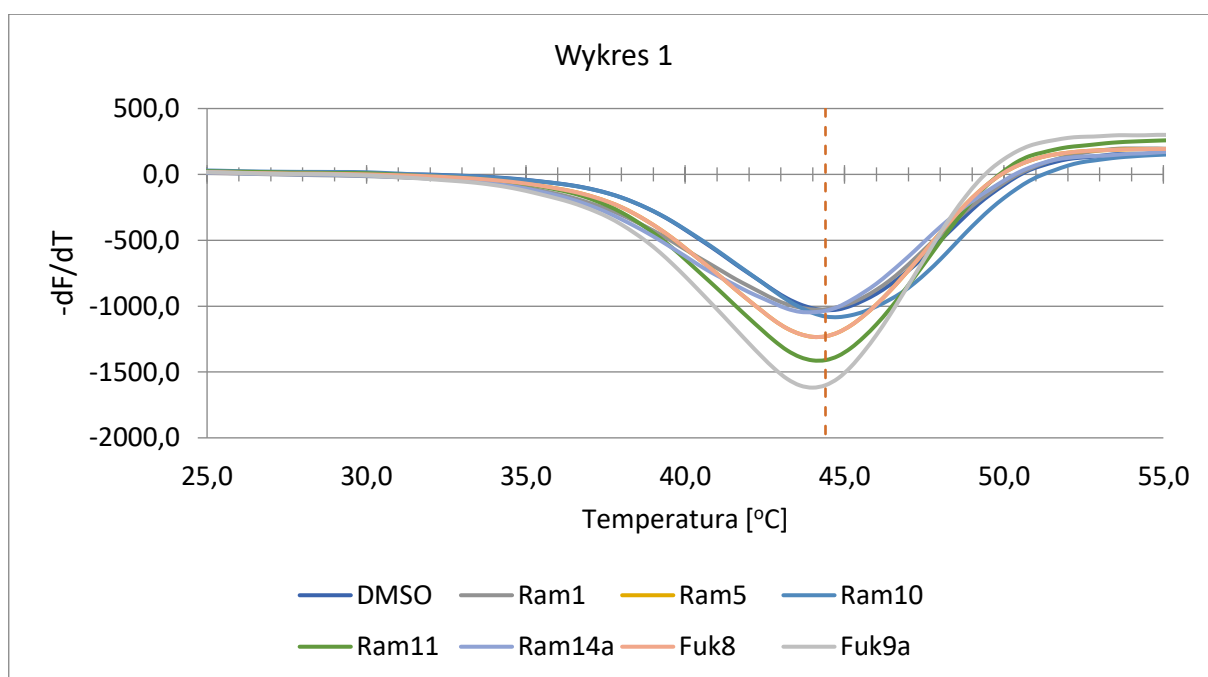
Schemat 39. ΔT_m dla NodZ w obecności wybranych nie cukrowych pochodnych.

W kolejnej części eksperymentów zbadano wiązanie się białka NodZ z otrzymanymi uprzednio pochodnymi cukrowymi. W celu polepszenia przejrzystości otrzymanych danych, wyniki podzielono na kilka podgrup, a na wykresach przedstawiono jedynie wyniki, dla których otrzymano przesunięcia pików topnienia ΔT_m .

Na **wykresie 1 (Rysunek 13)** przedstawiono wyniki dla I grupy pochodnych, które stanowiły substraty cukrowe i proste alkoksylowe pochodne otrzymane w ramach niniejszej pracy (**schemat 40**).



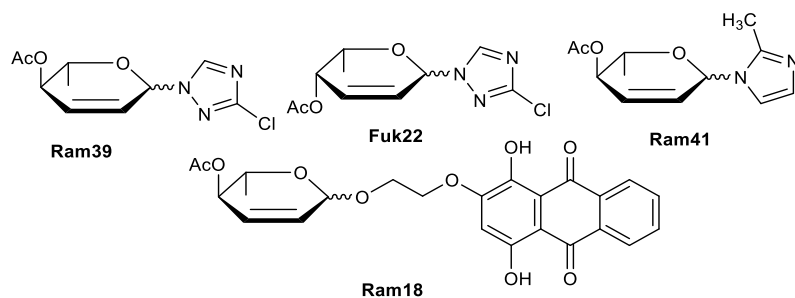
Schemat 40. Struktury badanych pochodnych zaklasyfikowanych do grupy I.



Rysunek 13. ΔT_m dla NodZ i wybranych badanych pochodnych cukrowych, należących do I grupy. Dane przedstawiono jako piki topnienia z wykorzystaniem pierwszej pochodnej emisji fluorescencji w funkcji temperatury ($-dF/dT$). ΔT_m reprezentowana jest jako najniższy punkt krzywej w odniesieniu do linii przerywanej.

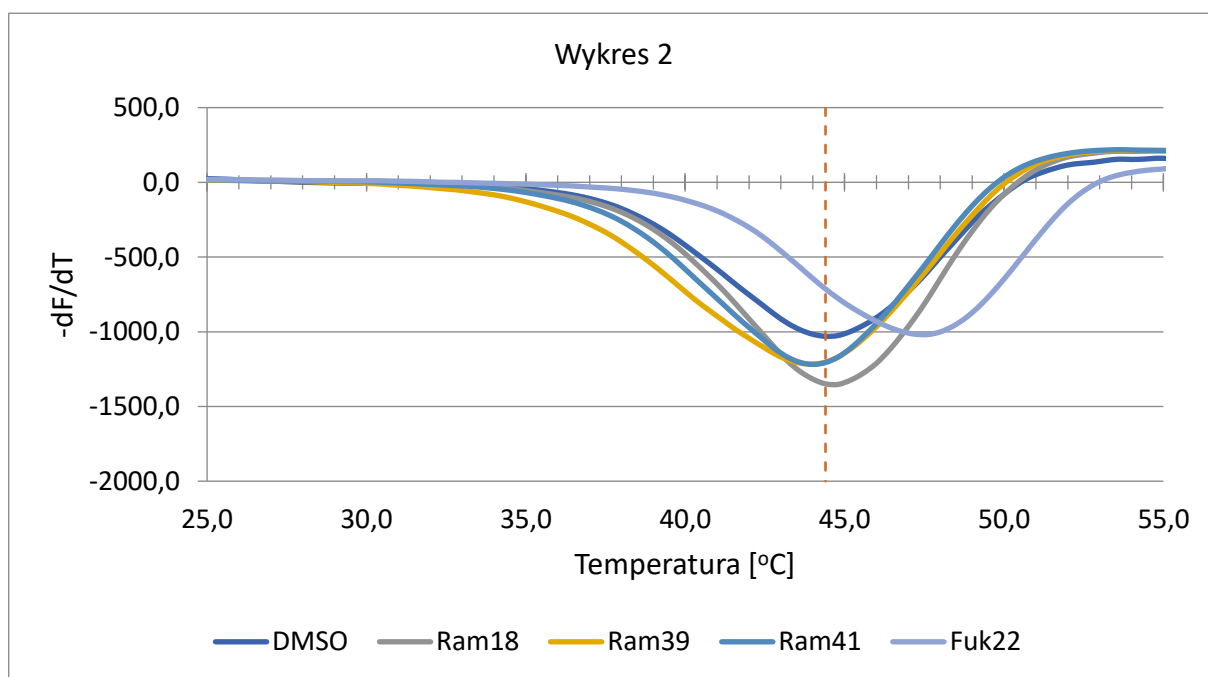
Niemal wszystkie (oprócz **Ram10**) spośród pochodnych tej grupy powodowały niewielkie przesunięcie piku topnienia ΔT_m wskazujące na destabilizujące (w dół) wiązanie się go z białkiem NodZ.

Na **wykresie 2 (Rysunek 14)** zaprezentowano wyniki otrzymane dla II grupy związków, którymi były pochodne oksadiazoli, triazoli oraz antrachinonów (**schemat 41**).



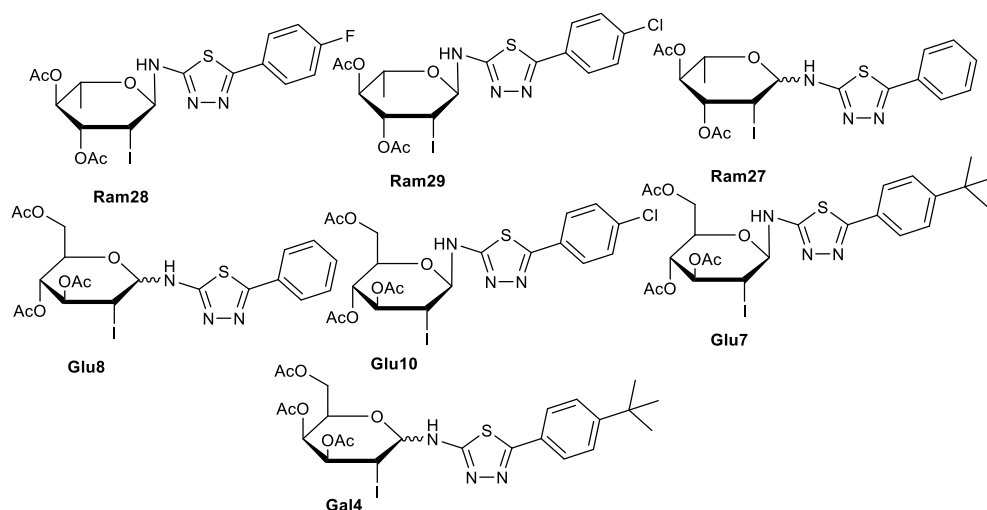
Schemat 41. Struktury badanych pochodnych zaklasyfikowanych do grupy II.

W tej grupie związków największą zmianę pikę topnienia ΔT_m otrzymano dla pochodnej **Fuk22** ($\Delta T_m=3.2$ °C). W niemal wszystkich pozostałych przypadkach ΔT_m wynosiło -0.4 °C.



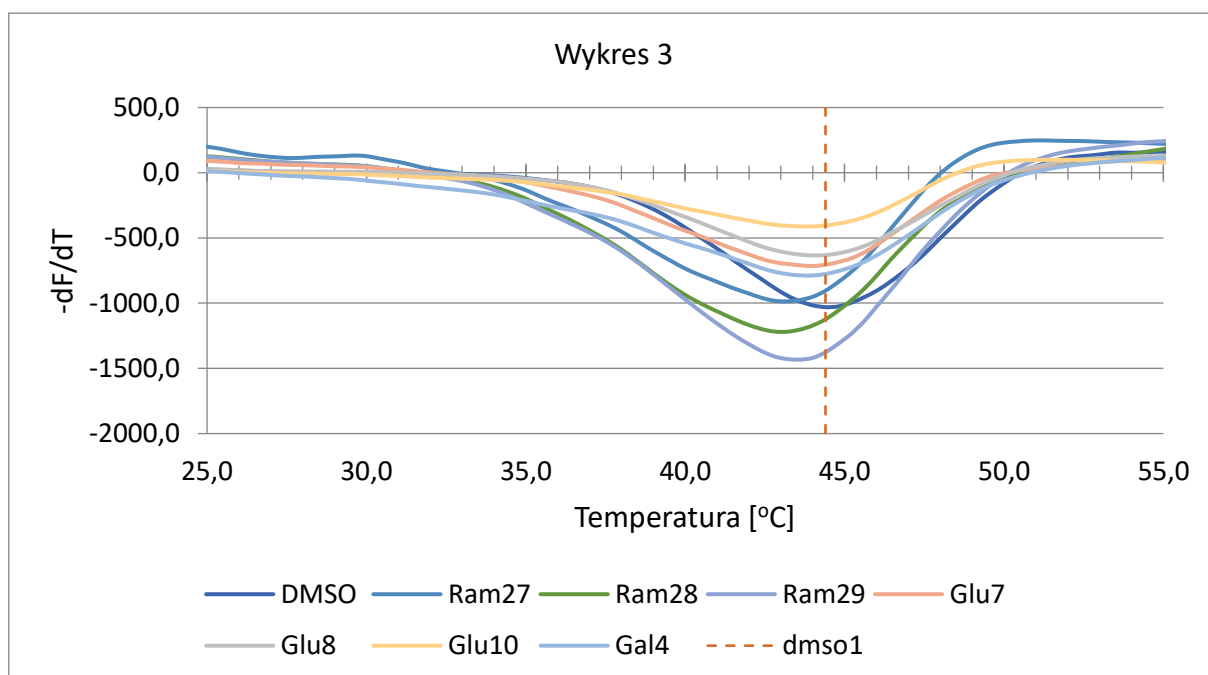
Rysunek 14. ΔT_m dla NodZ i wybranych badanych pochodnych cukrowych, należących do II grupy. Dane przedstawiono jako piki topnienia z wykorzystaniem pierwszej pochodnej emisji fluorescencji w funkcji temperatury ($-dF/dT$). ΔT_m reprezentowana jest jako najniższy punkt krzywej w odniesieniu do linii przerywanej.

Na **wykresie 3 (Rysunek 15)** przedstawiono wyniki otrzymane dla III grupy pochodnych, którą stanowiły otrzymane uprzednio pochodne tiadiazoli (**schemat 42**).



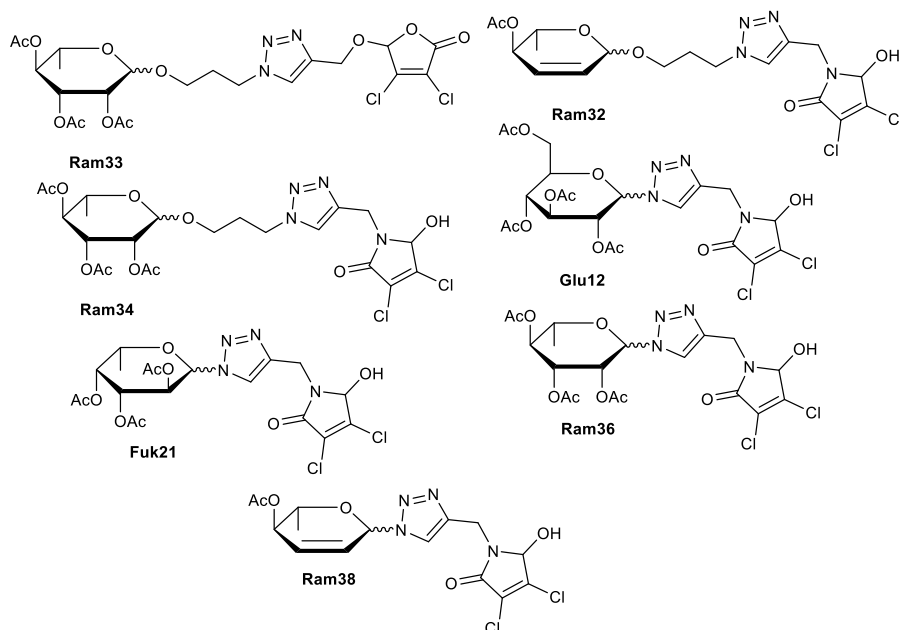
Schemat 42. Struktury badanych pochodnych zaklasyfikowanych do grupy III.

W tej grupie związków pochodna **Ram28** wykazała przesunięcie pików topnienia $\Delta T_m = -1.2$ °C, dla pochodnej **Ram29** ΔT_m wyznaczono jako -0.8 °C, natomiast w pozostałych przypadkach ΔT_m wynosiło -0.4 °C.

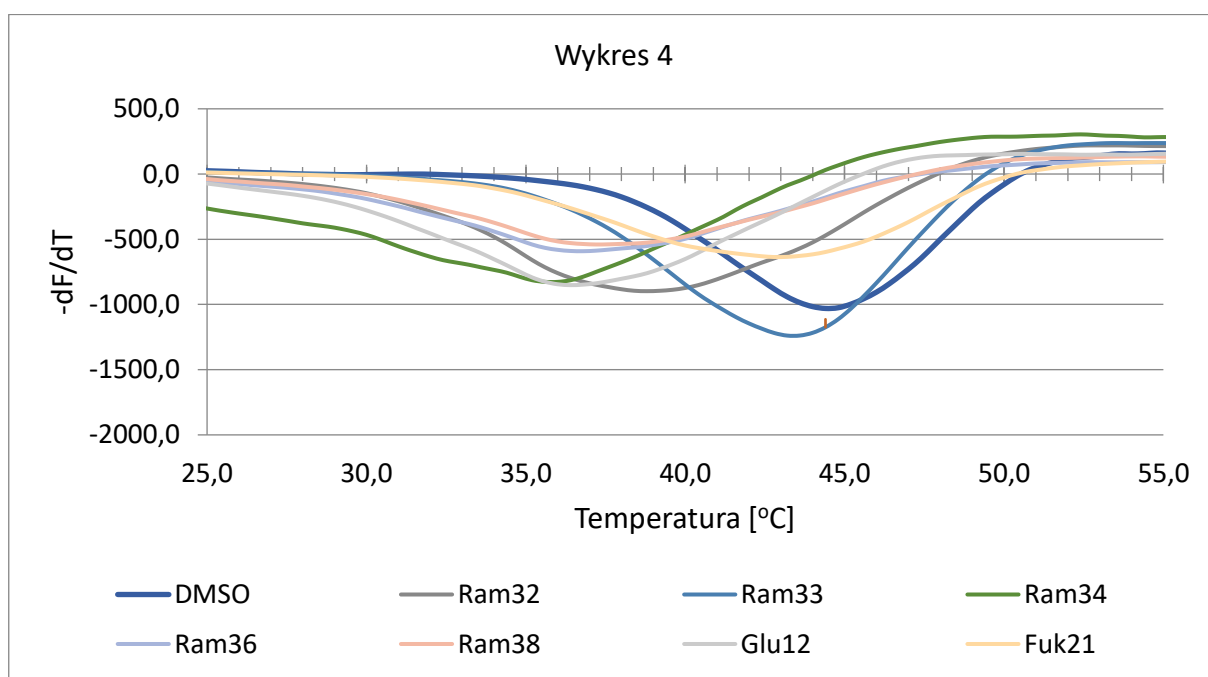


Rysunek 15. ΔT_m dla NodZ i wybranych badanych pochodnych cukrowych, należących do III grupy. Dane przedstawiono jako piki topnienia z wykorzystaniem pierwszej pochodnej emisji fluorescencji w funkcji temperatury ($-dF/dT$). ΔT_m reprezentowana jest jako najniższy punkt krzywej w odniesieniu do linii przerywanej.

Na **wykrasie 4 (Rysunek 16)** przedstawiono wyniki dla IV grupy pochodnych, którą stanowiły pochodne furan-2(5*H*)-onu oraz 2*H*-pirol-2-onu (**schemat 43**).



Schemat 43. Struktury badanych pochodnych zaklasyfikowanych do grupy IV.



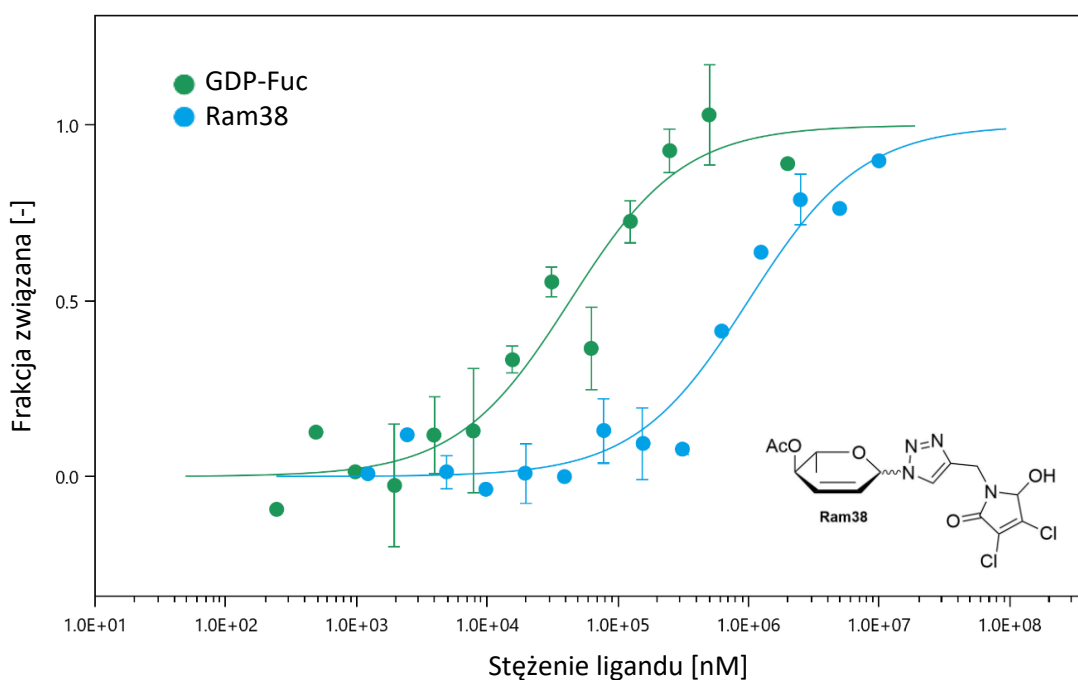
Rysunek 16. ΔT_m dla NodZ i wybranych badanych pochodnych cukrowych, należących do grupy IV. Dane przedstawiono jako piki topnienia z wykorzystaniem pierwszej pochodnej emisji fluorescencji w funkcji temperatury ($-dF/dT$). ΔT_m reprezentowana jest jako najniższy punkt krzywej w odniesieniu do linii przerywanej.

W grupie IV największe wartości ΔT_m otrzymano dla pochodnych **Ram32** ($\Delta T_m = -5.6$ °C), **Ram34** ($\Delta T_m = -8.4$ °C), **Glu12** ($\Delta T_m = -8.0$ °C), **Ram36** ($\Delta T_m = -7.6$ °C) i **Ram38** ($\Delta T_m = -7.2$ °C).

5.3.2. Termoforeza mikroskalowa (MST)

W kolejnym etapie postanowiono oznaczyć K_d dla otrzymanych związków. W pierwszej kolejności otrzymano K_d dla GDP- β -L-fukozy, a następnie przeprowadzono eksperymenty MST, mające określić czy dany związek wiąże się z białkiem. Ze względu na możliwe problemy z rozpuszczalnością, niepolarność i dużą objętość przestrzenną podstawników w tym eksperymencie badano jedynie związki: **Ram32**, **Ram38** i **Ram27**.

Analiza wyników wykazała wiązanie się z białkiem struktury **Ram38** (Rysunek 17). Udało się dla niej wygenerować K_d , jednak wartość ta obarczona jest dużym błędem ze względu na problemy z rozpuszczalnością badanego związku w wysokich stężeniach, co uniemożliwiło wygenerowanie krzywej w pełnym zakresie.



Rysunek 17. Krzywe wiązania NodZ z **Ram38** oraz **GDP-Fukozą** otrzymane metodą MST ($K_d = 998.788$ μ M dla **Ram38** oraz $K_d = 43.056$ dla **GDP-fukozy**). Dane otrzymano jako średnią z trzech powtórzeń i dopasowano do modelu wiązania K_d .

5.4. Podsumowanie badań biologicznych

Badania *in vitro* pochodnych 1,3,4-tiadiazolu oraz furan-2(5*H*)-onu i 2*H*-pirol-2-onu wskazują, że badane związki wpływają w różnym stopniu na żywotność komórek linii HCT116 i MCF-7, przy czym pochodne tiadiazolu wykazują mniejszy wpływ na przeżywalność komórek. Różnice te mogą wynikać z interakcji z innymi celami molekularnymi w komórce.

Równolegle przeprowadzono badanie oddziaływań wszystkich otrzymanych związków z białkiem bakteryjnej fukozylotransferazy 8 NodZ w teście TSA. Analiza wyników wykazała, że 25 spośród otrzymanych w ramach pracy badawczej pochodnych przesuwają pik topnienia białka, co może sugerować, że związki te wiążą się z białkiem NodZ. Jednak z powodu wystąpienia problemów z rozpuszczalnością, niepolarność i dużą objętość przestrzenną podstawników, a co za tym idzie możliwość potencjalnego wystąpienia agregatów, w kolejnym etapie badań zastosowano jedynie pochodne: **Ram32**, **Ram38** i **Ram27**.

Analiza wyników potwierdziła wiązanie się struktury **Ram38** z białkiem, dla którego wygenerowano K_d , jednak ze względu na trudności związane z rozpuszczalnością tego związku w wysokich stężeniach nie było możliwe wygenerowanie krzywej w pełnym zakresie. Z tego powodu koniecznym jest przeprowadzenie optymalizacji struktury polegającej na zbadaniu analogów L-fukozy i L-ramnozy z odbezpieczonymi grupami hydroksylowymi oraz na sprawdzeniu czy długość linkera między pirolem i triazolem (analogi z 1, 2 oraz 3-węglowym linkerem) wpłynie na poprawę aktywności badanych struktur.

Przeprowadzone badania dostarczają wstępnej oceny aktywności przeciwnowotworowej pochodnych otrzymanych w części syntetycznej i stanowią punkt wyjścia do dalszych badań.

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje:

K. Żurawska, M. Skonieczna, D. Burdalska, A. Byczek-Wyrostek, A. Dawicka, A. Kasprzycka, K. Walczak „Glycoconjugates of mucochloric acid – synthesis and biological activity”, *Pharmaceuticals*. 2023, 16(4), 525. <https://doi.org/10.3390/ph16040525>.

K. Żurawska, M. Stokowy, P. Kapica, M. Olesiejuk, A. Kudelko, K. Papaj, M. Skonieczna, W. Szeja, K. Walczak, A. Kasprzycka “Synthesis and preliminary anticancer activity assessment of N-glycosides of 2-amino-1,3,4-thiadiazoles”, *Molecules*. **2021**, 26, 7245. <https://doi.org/10.3390/molecules26237245>.

K. Papaj, P. Sychalska, K. Hopko, P. Kapica, A. Fisher, M. A. Lill, W. Bagrowska, J. Nowak, K. Szleper, M. Smieško, A. Kasprzycka, A. Góra “Investigation of thiocarbamates as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 Mpro”. *Pharmaceuticals*. **2021**, 14, 1153. <https://doi.org/10.3390/ph14111153>.

R. Kitel, A. Byczek-Wyrostek, K. Hopko, A. Kasprzycka, K. Walczak “Effect of Selected Silyl Groups on the Anticancer Activity of 3,4-Dibromo-5-Hydroxy-Furan-2(5H)-One Derivatives”. *Pharmaceuticals*. **2021**, 14, 1079. <https://doi.org/10.3390/ph14111079>.

M. Bzówka, K. Mitusińska, K. Hopko, A. Góra “Computational insights into the known inhibitors of human soluble epoxide hydrolase”. *Drug. Discov.* **2021**, 26, 1914-1921. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.017>.

Zgłoszenie patentowe:

Kasprzycka A., Szeja W., Szeja W., Żurawska K., Woźniak M., Makuch S., Wiśniewski J., Cichoń T., Pilny E.; Prolek – Glikokoniugat pochodny gemcytabiny, jako nowy związek o działaniu przeciwnowotworowym, sposób otrzymywania i zastosowanie; zgłoszenie patentowe, 2022, P.442924 [WIPO ST 10/C PL442924].

Wystąpienia na konferencjach:

K. Żurawska, D. Burdalska, M. Skonieczna, A. Byczek-Wyrostek, A. Dawicka, A. Kasprzycka, K. Walczak "Synthesis and Biological Activity of Glycoconjugates of Mucochloric Acid", 7th Fluorine Days, 18-22.06.2023, Poznań.

A. Kasprzycka, K. Żurawska, G. Pastuch-Gawołek, M. Domińska, M. Woźniak, S. Makuch, S. Agrawal, T. Cichoń, E. Pilny, W. Szeja "GLUT-targeting improves the properties of drug glycoconjugates in relations to neoplastic cells", XXV Gliwice Scientific Meetings/Gliwickie Spotkania Naukowe, 19-20.11.2021, Gliwice.

M. Jeleń, K. Pluta, B. Morak-Młodawska, M. Szmielew, M. Skonieczna, A. Kasprzycka, K. Hopko "New angularly condensed diquinothiazines as an anticancer agents", X Konwersatorium Chemii Medycznej, 3-5.09.2021, Lublin.

M. Bzówka, K. Mitusinska, A. Raczynska, A. Samol, A. Fischer, M. Sellner, K. Papaj, P. Spychalska, P. Kapica, K. Hopko, W. Bagrowska, K. Szeleper, A. Kasprzycka, J.A. Tuszyński, M.A. Lill, M. Smieško, A. Góra "SARS-CoV-2 Mpro as a challenging molecular target for small-molecule inhibitor design". 3-8.07.2021, Ljubljana, Słowenia.

K. Hopko, M. Skonieczna, D. Burdalska, A. Byczek-Wyrostek, A. Kasprzycka, K. Walczak "Glikokoniugaty pochodne kwasu dichloromukowego – synteza i aktywność", Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Zrozumieć Naukę" IV edycja, 26.09.2020.

W. Bagrowska, K. Hopko, K. Mitusińska, R. Kitel, A. Kasprzycka, A. Góra "Poszukiwane inhibitorów dla FUT8", Śląskie Spotkania Naukowe, 29-30.05.2020, Gliwice.

M. Bzówka, K. Mitusińska, A. Raczynska, A. Samol, K. Papaj, P. Spychalska, A. Kasprzycka, D.

Shyntum, P. Kapica, K. Hopko, W. Bagrowska, R. Jaundoo, J. A. Tuszyński, A. Góra „Poszukiwanie nowej strategii terapeutycznej skierowanej przeciwko głównej proteazie wirusa SARS-COV-2”, Śląskie Spotkania Naukowe, 29-30.05.2020, Gliwice.

W. Bagrowska, K. Hopko, K. Mitusińska, R. Kitel, A. Kasprzycka, A. Góra "Searching for the alpha-1,6-fucosyltransferase inhibitors", Gliwice Scientific Meetings, 22-23.11.2019, Gliwice.

K. Hopko, M. Stokowy, P. Kapica, R. Kitel, A. Byczek-Wyrostek, K. Walczak, A. Kasprzycka, „Otrzymywanie inhibitorów FUT8 typu first in class”, Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, 14-16.11.2018, Warszawa.

K. Hopko, P. Walińko, M. Biela, R. Kitel, K. Walczak, A. Kasprzycka, „Synteza pochodnych antrachinonu o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym”, *Pomiędzy naukami – Zjazd Fizyków i Chemików*, 15.09.2017, Chorzów.

K. Hopko, M. Krzysztoń, M. Lis, R. Kitel, K. Walczak, A. Kasprzycka, „Nowe pochodne L-fukozy jako inhibitory fukozylotransferazy 8”, *Pomiędzy Naukami – zjazd fizyków i chemików*, 16.09.2016, Chorzów.

Udział w projektach badawczych:

OPUS 2016/21/B/NZ7/01766 pt. „Nowe pochodne 2(5*H*)-furanonu z modulacją hydrofobowości podstawników - synteza, cele molekularne, mechanizm działania i aktywność przeciwnowotworowa in vitro w liniach komórkowych raka piersi”, wykonawca.

LITERATURA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. The Global Cancer Observatory - All cancers. *Int Agency Res Cancer - WHO*. 2020;419:199-200. <https://gco.iarc.fr/today/home>
2. Romero-Garcia S, Lopez-Gonzalez JS, Báez-Viveros JL, Aguilar-Cazares D, Prado-Garcia H. Tumor cell metabolism. *Cancer Biol Ther*. 2011;12(11):939-948. doi:10.4161/cbt.12.11.18140
3. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(14):1213-1221. doi:10.2174/1389201017666160808160513
4. Pant K, Richard S, Peixoto E, Gradilone SA. Role of Glucose Metabolism Reprogramming in the Pathogenesis of Cholangiocarcinoma. *Front Med*. 2020;7:113. doi:10.3389/fmed.2020.00113
5. Sreedhar A, Zhao Y. Dysregulated metabolic enzymes and metabolic reprogramming in cancer cells. *Biomed Reports*. 2018;8:3-10. doi:10.3892/br.2017.1022
6. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23:74-88. doi:10.1038/s41580-021-00404-3
7. Sarnowska E, Leszczyński M, Macech-Klicka E, Stachowiak M, Siedlecki JA. Zaburzenia metabolizmu i funkcji enzymów metabolicznych a proces nowotworzenia. *Nowotw J Oncol*. 2016;66(2):151-159. doi:10.5603/NJO.2016.0024
8. Munisamy M, Mukherjee N, Thomas L, et al. Therapeutic opportunities in cancer therapy: targeting the p53-MDM2/MDMX interactions. *Am J Cancer Res*. 2021;11(12):5762-5781. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35018225> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC8727821>
9. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19:448. doi:10.3390/ijms19020448
10. Kopan R. Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(10):1-4. doi:10.1101/cshperspect.a011213
11. Becker DJ, Lowe JB. Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*. 2003;13(7):41R-53R. doi:10.1093/glycob/cwg054
12. Bastian K, Scott E, Elliott DJ, Munkley J. FUT8 Alpha-(1,6)-Fucosyltransferase in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22:455. doi:10.3390/ijms22010455
13. Orczyk-Pawłowicz M. Znaczenie fukozytacji glikokoniugatów w zdrowiu i chorobie. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2007;61:240-252.
14. Ma B, Simala-Grant JL, Taylor DE. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology*. 2006;16(12):158R-184R. doi:10.1093/glycob/cwl040
15. Tu Z, Lin Y-N, Lin C-H. Development of fucosyltransferase and fucosidase inhibitors. *Chem Soc Rev*. 2013;42:4459-4475. doi:10.1039/c3cs60056d
16. Tu L, Banfield DK. Localization of Golgi-resident glycosyltransferases. *Cell Mol*

- Life Sci.* 2010;67:29-41. doi:10.1007/s00018-009-0126-z
17. Hosoguchi K, Maeda T, Furukawa J, et al. An Efficient Approach to the Discovery of Potent Inhibitors against Glycosyltransferases. *J Med Chem.* 2010;53:5607-5619. doi:10.1021/jm100612r
 18. Järvå MA, Dramicanin M, Lingford JP, et al. Structural basis of substrate recognition and catalysis by fucosyltransferase 8. *J Biol Chem.* 2020;295(19):6677-6688. doi:10.1074/jbc.RA120.013291
 19. Izumi M, Yuasa H, Hashimoto H. Bisubstrate Analogues as Glycosyltransferase Inhibitors. *Curr Top Med Chem.* 2009;9:87-105. doi:10.2174/156802609787354351
 20. Merino P, Tejero T, Delso I, Hurtado-Guerrero R, Gómez-SanJuan A, Sádaba D. Recent Progress on Fucosyltransferase Inhibitors. *Mini-Reviews Med Chem.* 2012;12(14):1455-1464. doi:10.2174/138955712803832753
 21. Burkart MD, Vincent SP, Düffels A, et al. Chemo-Enzymatic Synthesis of Fluorinated Sugar Nucleotide: Useful Mechanistic Probes for Glycosyltransferases. *Bioorg Med Chem.* 2000;8(8):1937-1946. doi:10.1016/S0968-0896(00)00139-5
 22. Norris AJ, Whitelegge JP, Strouse MJ, Faull KF, Toyokuni T. Inhibition kinetics of carba- and C-fucosyl analogues of GDP-fucose against fucosyltransferase V: implication for the reaction mechanism. 2004;14:571-573. doi:10.1016/j.bmcl.2003.12.003
 23. Arjona O, Gómez AM, López JC, Plumet J. Synthesis and Conformational and Biological Aspects of Carbasugars. *Chem Rev.* 2007;107(5):1919-2036.
 24. Mitchell ML, Tian F, Lee L V., Wong C-H. Synthesis and Evaluation of Transition-State Analogue Inhibitors of α -1,3-Fucosyltransferase. *Angew Chem Int Ed.* 2002;41(16):3041-3044.
 25. Mong TK-K, Lee L V., Brown JR, Esko JD, Wong C-H. Synthesis of N-Acetyllactosamine Derivatives with Variation in the Aglycon Moiety for the Study of Inhibition of Sialyl Lewis x Expression. *ChemBioChem.* 2003;4:835-840. doi:10.1002/cbic.200300650
 26. Palcic MM, Heerze LD, Srivastava OP, Hindsgaul O. A Bisubstrate Analog Inhibitor for α (1 \rightarrow 2)-Fucosyltransferase. *J Biol Chem.* 1989;264(29):17174-17181. doi:10.1016/S0021-9258(18)71475-0
 27. Izumi M, Kaneko S, Yuasa H, Hashimoto H. Synthesis of bisubstrate analogues targeting α -1,3-fucosyltransferase and their activities. *Org Biomol Chem.* 2006;4:681-690. doi:10.1039/b513897c
 28. Kamińska J, Dziecioł J, Kościelak J. Triazine dyes as inhibitors and affinity ligands of glycosyltransferases. *Glycoconj J.* 1999;16:719-723. doi:10.1023/A:1007111526799
 29. Niu X, Fan X, Sun J, Ting P, Narula S, Lundell D. Inhibition of fucosyltransferase VII by gallic acid and its derivatives. *Arch Biochem Biophys.* 2004;425:51-57. doi:10.1016/j.abb.2004.02.039
 30. Lin T-W, Chang W-W, Chen C-C, Tsai Y-C. Stachybotrydial, a potent inhibitor of

- fucosyltransferase and sialyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331:953-957. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.232
31. Lee L V, Mitchell ML, Huang S, Fokin V V, Sharpless KB, Wong C. A Potent and Highly Selective Inhibitor of Human α -1,3-Fucosyltransferase via Click Chemistry. *J Am Chem Soc*. 2003;125(32):9588-9589.
 32. Bryan MC, Lee L V., Wong C-H. High-throughput identification of fucosyltransferase inhibitors using carbohydrate microarrays. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2004;14:3185-3188. doi:10.1016/j.bmcl.2004.04.001
 33. Ihara H, Ikeda Y, Toma S, et al. Crystal structure of mammalian α 1,6-fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology*. 2007;17(5):455-466. doi:10.1093/glycob/cwl079
 34. Yang Q, Wang L-X. Mammalian α -1,6-Fucosyltransferase (FUT8) Is the Sole Enzyme Responsible for the N-Acetylglucosaminyltransferase I-independent Core Fucosylation of High-mannose N-Glycans. *J Biol Chem*. 2016;291(21):11064-11071. doi:10.1074/jbc.M116.720789
 35. Wang X, Inoue S, Gu J, et al. Dysregulation of TGF- β 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *PNAS*. 2005;102(44):15791-15796. doi:10.1073/pnas.0507375102
 36. Ihara H, Ikeda Y, Taniguchi N. Reaction mechanism and substrate specificity for nucleotide sugar of mammalian α 1,6-fucosyltransferase - a large-scale preparation and characterization of recombinant human FUT8. *Glycobiology*. 2006;16(4):333-342. doi:10.1093/glycob/cwj068
 37. Schneider M, Al-Shareffi E, Haltiwanger RS. Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology*. 2017;27(7):601-618. doi:10.1093/glycob/cwx034
 38. Miyoshi E, Uozumi N, Noda K, Hauashi N, Hori M, Taniguchi N. Expression of α 1-6 Fucosyltransferase in Rat Tissues and Human Cancer Cell Lines. *Int J Cancer*. 1997;72:1117-1121.
 39. Nakakita S, Menon KK, Natsuka S, Ikenaka K, Hase S. β 1-4Galactosyltransferase Activity of Mouse Brain as Revealed by Analysis of Brain-Specific Complex-Type N-Linked Sugar Chains. *J Biochem*. 1999;126(6):1161-1169. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022562
 40. Fukuda T, Hashimoto H, Okayasu N, et al. α 1,6-Fucosyltransferase-deficient Mice Exhibit Multiple Behavioral Abnormalities Associated with a Schizophrenia-like Phenotype: Importance of the Balance Between the Dopamine and Serotonin Systems. *J Biol Chem*. 2011;286(21):18434-18443. doi:10.1074/jbc.M110.172536
 41. Kudo T, Fujii T, Ikegami S, et al. Mice lacking α 1,3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis x structure in brain and increased anxiety-like behaviors. *Glycobiology*. 2007;17(1):1-9. doi:10.1093/glycob/cwl047
 42. Malý P, Thall AD, Petryniak B, et al. The α (1,3)Fucosyltransferase Fuc-TVII Controls Leukocyte Trafficking through an Essential Role in L-, E-, and P-selectin Ligand Biosynthesis. *Cell*. 1996;86(4):643-653. doi:10.1016/S0092-

8674(00)80137-3

43. Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T. Biological Function of Fucosylation in Cancer Biology. *J Biochem*. 2008;143(6):725-729. doi:10.1093/jb/mvn011
44. Fujii H, Shinzaki S, Iijima H, et al. Core Fucosylation on T cells, Required for Activation of T-cell Receptor Signaling and Induction of Colitis in Mice, is Increased in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2016;150(7):1620-1632. doi:10.1053/j.gastro.2016.03.002
45. Li QK, Chen L, Ao MH, et al. Serum fucosylated prostate-specific antigen (PSA) improves the differentiation of aggressive from non-aggressive prostate cancers. *Theranostics*. 2015;5(3):267-276. doi:10.7150/thno.10349
46. Rombouts Y, Jónasdóttir HS, Ederveen ALH, et al. Acute phase inflammation is characterized by rapid changes in plasma/peritoneal fluid N-glycosylation in mice. *Glycoconj J*. 2016;33:457-470. doi:10.1007/s10719-015-9648-9
47. García-García A, Serna S, Yang Z, et al. FUT8-Directed Core Fucosylation of N-glycans Is Regulated by the Glycan Structure and Protein Environment. *ACS Catal*. 2021;11(15):9052-9065. doi:10.1021/acscatal.1c01698
48. Lin S, Zhou L, Dong Y, et al. Alpha-(1,6)-fucosyltransferase (FUT8) affects the survival strategy of osteosarcoma by remodeling TNF / NF- κ B2 signaling. *Cell Death Dis*. 2021;12(August):1124. doi:10.1038/s41419-021-04416-x
49. García-García A, Ceballos-Laita L, Serna S, et al. Structural basis for substrate specificity and catalysis of α 1,6-fucosyltransferase. *Nat Commun*. 2020;11:973. doi:10.1038/s41467-020-14794-z
50. Okada M, Chikuma S, Kondo T, et al. Blockage of Core Fucosylation Reduces Cell-Surface Expression of PD-1 and Promotes Anti-tumor Immune Responses of T Cells. *Cell Rep*. 2017;20:1017-1028. doi:10.1016/j.celrep.2017.07.027
51. Pereira NA, Chan KF, Lin PC, Song Z. The “less-is-more” in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *MAbs*. 2018;10(5):693-711. doi:10.1080/19420862.2018.1466767
52. Tu C-F, Wu M-Y, Lin Y-C, Kannagi R, Yang R-B. FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF- β receptor core fucosylation. *Brest Cancer Res*. 2017;19:111. doi:10.1186/s13058-017-0904-8
53. Matsumoto K, Yokote H, Arao T, et al. N-Glycan fucosylation of epidermal growth factor receptor modulates receptor activity and sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci*. 2008;99(8):1611-1617. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00847.x
54. Zhao Y, Itoh S, Wang X, et al. Deletion of Core Fucosylation on α 3 β 1 Integrin Down-regulates Its Functions. *J Biol Chem*. 2006;281(50):38343-38350. doi:10.1074/jbc.M608764200
55. Hu P, Shi B, Geng F, Zhang C, Wu W, Wu XZ. E-cadherin core fucosylation regulates nuclear β -catenin accumulation in lung cancer cells. *Glycoconj J*. 2008;25:843-850. doi:10.1007/s10719-008-9144-6
56. Liang C, Fukuda T, Isaji T, et al. α 1,6-Fucosyltransferase contributes to cell

- migration and proliferation as well as to cancer stemness features in pancreatic carcinoma. *BBA - Gen Subj.* 2021;1865:129870. doi:10.1016/j.bbagen.2021.129870
57. Luo G, Fan Z, Cheng H, et al. New observations on the utility of CA19-9 as a biomarker in Lewis negative patients with pancreatic cancer. *Pancreatology.* 2018;18:971-976. doi:10.1016/j.pan.2018.08.003
 58. Hu H, Li Z, Zhou Y, et al. GLT8D1 overexpression as a novel prognostic biomarker in human cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2019;29(6):612-620. doi:10.1097/CMR.0000000000000631
 59. Gomes C, Almeida A, Barreira A, et al. Carcinoembryonic antigen carrying SLex as a new biomarker of more aggressive gastric carcinomas. *Theranostics.* 2019;9(24):7431-7446. doi:10.7150/thno.33858
 60. Lv Y, Zhang Z, Tian S, Wang W, Li H. Therapeutic potential of fucosyltransferases in cancer and recent development of targeted inhibitors. *Drug Discov Today.* 2023;28(1):103394. doi:10.1016/j.drudis.2022.103394
 61. Rillahan CD, Antonopoulos A, Lefort CT, et al. Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nat Chem Biol.* 2012;8(7):661-668. doi:10.1038/nchembio.999
 62. Jones BE. Compounds for inhibiting fucosylation and methods for using the same. Published online 2020.
 63. Strecker C, Baerenfaenger M, Mieke M, Spiller E, Meyer B. In Silico Evaluation of the Binding Site of Fucosyltransferase 8 and First Attempts to Synthesize an Inhibitor with Drug-Like Properties. *ChemBioChem.* 2019;20:1-10. doi:10.1002/cbic.201900289
 64. Manabe Y, Kasahara S, Takakura Y, et al. Development of α 1,6-fucosyltransferase inhibitors through the diversity-oriented syntheses of GDP-fucose mimics using the coupling between alkyne and sulfonyl azide. *Bioorg Med Chem.* 2017;25(11):2844-2850. doi:10.1016/j.bmc.2017.02.036
 65. Elliott TS, Slowey A, Ye Y, Conway SJ. The use of phosphate bioisosteres in medicinal chemistry and chemical biology. *Medchemcomm.* 2012;3(7):735-751. doi:10.1039/c2md20079a
 66. Greene TW, Wuts PGM. Protection for the hydroxyl group, including 1,2- and 1,3-diols. In: *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis.* Fourth Ed. Wiley Online Library; 2007:16-366. doi:10.1002/9780470053485.ch2
 67. Redemann CE, Niemann C. Acetobromoglucose. *Org Synth.* 1955;3:11. doi:10.15227/orgsyn.022.0001
 68. Zhao J, Wei S, Ma X, Shao H. A simple and convenient method for the synthesis of pyranoid glycols. *Carbohydr Res.* 2010;345:168-171. doi:10.1016/j.carres.2009.10.003
 69. Alhassan A-B, McCutcheon DC, Zeller M, Norris P. Azidonitration of Di-O-acetyl-L-fucal: X-Ray Crystal Structures of Intermediate Azidodeoxysugars and of the Bacterial Aminosugar N-Acetyl-L-fucosamine. *J Carbohydr Chem.* 2012;31:371-383. doi:10.1080/07328303.2012.658125

70. Wu J, Kopp A, Ackermann L. Synthesis of C-Oligosaccharides through Versatile C(sp³)-H Glycosylation of Glycosides. *Angew Chemie - Int Ed.* 2022;61:1-7. doi:10.1002/anie.202114993
71. Wang J, Deng C, Zhang Q, Chai Y. Tuning the Chemoselectivity of Silyl Protected Rhamnals by Temperature and Brønsted Acidity: Kinetically Controlled 1,2-Addition vs Thermodynamically Controlled Ferrier Rearrangement. *Org Lett.* 2019;21(4):1103-1107. doi:10.1021/acs.orglett.9b00009
72. Ding F, William R, Wang F, Ma J, Ji L, Liu X-W. A Short and Highly Efficient Synthesis of L-Ristosamine and L-epi-Daunosamine Glycosides. *Org Lett.* 2011;13(4):652-655. doi:10.1021/ol102891t
73. Lu Z, Li Y, Xiang S, et al. Acid Catalyzed Stereocontrolled Ferrier-Type Glycosylation Assisted by Perfluorinated Solvent. *Molecules.* 2022;27:7234.
74. Alley SC, Jeffrey SC, Sussman D, Benjamin DR, Toki B, Burke PJ. Methods and Compositions for Making Antibodies and Antibody Derivatives with Reduced Core Fucosylation. Published online 2012:1-47.
75. Singh RP, Shreeve JM. Recent Highlights in Electrophilic Fluorination with 1-Chloromethyl-4-fluoro-1,4-diazonibicyclo[2.2.2]octane Bis(tetrafluoroborate). *Acc Chem Res.* 2004;37:31-44.
76. Dheer D, Singh V, Shankar R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorg Chem.* 2017;71:30-54. doi:10.1016/j.bioorg.2017.01.010
77. Liang L, Astruc D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview. *Coord Chem Rev.* 2011;255:2933-2945. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.028
78. Kuczynska K, Bończak B, Rárová L, et al. Synthesis and cytotoxic activity of 1,2,3-triazoles derived from 2,3-seco-dihydrobetulin via a click chemistry approach. *J Mol Struct.* 2022;1250:131751. doi:10.1016/j.molstruc.2021.131751
79. Krawczyk M, Pastuch-Gawołek G, Pluta A, Erfurt K, Domiński A, Kurcok P. 8-Hydroxyquinoline Glycoconjugates: Modifications in the Linker Structure and Their Effect on the Cytotoxicity of the Obtained Compounds. *Molecules.* 2019;24:4181. doi:10.3390/molecules24224181
80. Gómez AM, Lobo F, Uriel C, López JC. Recent Developments in the Ferrier Rearrangement. *Eur J Org Chem.* 2013;2013(32):7221-7262. doi:10.1002/ejoc.201300798
81. Ferrier RJ, Hoberg JO. Synthesis and reactions of unsaturated sugars. In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* Vol 58. ; 2003:55-119. doi:10.1016/S0065-2318(03)58003-9
82. Konstantinović S, Predojević J, Gojković S, Pavlović V, Csanádi J. The Ferrier rearrangement as the key step in the synthesis of C7-C16-alkyl 2,3-dideoxy glucosides from glucose and C7-C16-alkanols1-3. *J Serbian Chem Soc.* 2001;66(8):499-505. doi:10.2298/jsc0108499k
83. Jose V, Diana EJ, Kanchana US, Mathew T V. Current trends and advancements in Ferrier and Petasis-Ferrier rearrangement. *J Organomet Chem.* 2023;991:122691. doi:10.1016/j.jorganchem.2023.122691

84. Yadav JS, Reddy BVS, Rao CV, Chand PK, Prasad AR. Iodine-Catalyzed Stereoselective Synthesis of Allylglycosides, Glycosyl Cyanides and Glycosyl azides. *Synlett*. 2001;10:1638-1640. doi:10.1055/s-2001-17438
85. Wolf N, Kersting L, Herok C, Mihm C, Seibel J. High-Yielding Water-Soluble Asymmetric Cyanine Dyes for Labeling Applications. *J Org Chem*. 2020;85:9751-9760. doi:10.1021/acs.joc.0c01084
86. Tanaka H, Yamaguchi S, Yoshizawa A, Takagi M, Shin-ya K, Takahashi T. Combinatorial Synthesis of Deoxyhexasaccharides Related to the Landomycin A Sugar Moiety, Based on an Orthogonal Deprotection Strategy. *Chem Asian J*. 2010;5:1407-1424. doi:10.1002/asia.200900640
87. Percec V, Leowanawat P, Sun H-J, et al. Modular Synthesis of Amphiphilic Janus Glycodendrimers and Their Self-Assembly into Glycodendrimersomes and Other Complex Architectures with Bioactivity to Biomedically Relevant Lectins. *J Am Chem Soc*. 2013;135:9055-9077. doi:10.1021/ja403323y
88. Bergeron-Brlek M, Shiao TC, Trono MC, Roy R. Synthesis of a small library of bivalent α -D-mannopyranosides for lectin cross-linking. *Carbohydr Res*. 2011;346:1479-1489. doi:10.1016/j.carres.2011.03.041
89. Zhang R, Huang C, Wu F, et al. Review on melanosis coli and anthraquinone-containing traditional Chinese herbs that cause melanosis coli. *Front Pharmacol*. 2023;14:1160480. doi:10.3389/fphar.2023.1160480
90. Singh J, Hussain Y, Luqman S, Meena A. Purpurin: A natural anthraquinone with multifaceted pharmacological activities. *Phyther Res*. 2021;35:2418-2428. doi:10.1002/ptr.6965
91. Budniok S, Walczak KZ. Convenient Synthesis of 1,4-Dihydroxy-2-(ω -Hydroxyalkoxy)Anthracene- 9,10-Diones and their Conjugation with D-Glucal. *Lett Org Chem*. 2012;9:539-544. doi:10.2174/157017812802850195
92. Naeimi H, Namdari R. Rapid, efficient and one pot synthesis of anthraquinone derivatives catalyzed by Lewis acid/methanesulfonic acid under heterogeneous conditions. *Dye Pigment*. 2009;81:259-263. doi:10.1016/j.dyepig.2008.10.019
93. Youn SW, Kim YH. Pd(II)/Ag(I)-Promoted One-Pot Synthesis of Cyclic Ureas from (Hetero)Aromatic Amines and Isocyanates. *Org Lett*. 2016;18:6140-6143. doi:10.1021/acs.orglett.6b03151
94. Guo H, Hao J, Sun T, Wang Z, Cao J, Zhang G. Green synthesis of N-(2-hydroxyethyl)anilines by the selective alkylation reaction in H₂O. *Synth Commun*. 2020;50(20):3093-3098. doi:10.1080/00397911.2020.1793205
95. List M, Puchinger H, Gabriel H, Monkowius U, Schwarzinger C. N-Methylmelamines - Synthesis, Characterization, and Physical Properties. *J Org Chem*. 2016;81(10):4066-4075. doi:10.1021/acs.joc.6b00355
96. Zheng M, Xu C, Ma J, et al. Synthesis and antitumor evaluation of a novel series of triaminotriazine derivatives. *Bioorganic Med Chem*. 2007;15(4):1815-1827. doi:10.1016/j.bmc.2006.11.028
97. Plebanek E, Chevrier F, Roy V, et al. Straightforward synthesis of 2,4,6-trisubstituted 1,3,5-triazine compounds targeting cysteine cathepsins K and S.

- Eur J Med Chem.* 2016;121:12-20. doi:10.1016/j.ejmech.2016.05.009
98. Zhou Y, Sun Z, Froelich JM, Hermann T, Wall D. Structure-activity relationships of novel antibacterial translation inhibitors: 3,5-Diamino-piperidinyl triazines. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2006;16:5451-5456. doi:10.1016/j.bmcl.2006.07.052
99. Lee L, Leroux YR, Hapiot P, Downard AJ. Amine-terminated monolayers on carbon: preparation, characterization, and coupling reactions. *Langmuir.* 2015;31(18):5071-5077. doi:10.1021/acs.langmuir.5b00730
100. Samineni R, Eda V, Rao P, Sen S, Oruganti S. Grignard Reagents as Niche Bases in the Synthesis of Pharmaceutically Relevant Molecules. *Chem Sel.* 2022;7(5):1-12. doi:10.1002/slct.202102853
101. Yrjölä S, Kalliokoski T, Laitinen T, Poso A, Parkkari T, Nevalainen T. Discovery of novel cannabinoid receptor ligands by a virtual screening approach: Further development of 2,4,6-trisubstituted 1,3,5-triazines as CB2 agonists. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48:9-20. doi:10.1016/j.ejps.2012.10.020
102. Mangione MI, Spanevello RA, Anzardi MB. Efficient and straightforward click synthesis of structurally related dendritic triazoles. *RSC Adv.* 2017;7(75):47681-47688. doi:10.1039/c7ra09558a
103. Kofman TP, Krasnov KN. Reactions of 3-Azido-1,2,4-triazole with Electrophiles. *Russ J Org Chem.* 2004;40(11):1651-1656. doi:10.1002/chin.200522130
104. Dornan MH, Krishnan R, MacKlin AM, et al. First-in-class small molecule potentiators of cancer virotherapy. *Sci Rep.* 2016;6:26786. doi:10.1038/srep26786
105. Tsutsui N, Tanabe G, Gotoh G, et al. Structure-activity relationship studies on acremomannolipin A, the potent calcium signal modulator with a novel glycolipid structure 2: Role of the alditol side chain stereochemistry. *Bioorg Med Chem.* 2014;22(3):945-959. doi:10.1016/j.bmc.2013.12.052
106. Levecque P, Gammon DW, Jacobs P, De Vos D, Sels B. The use of ultrastable Y zeolites in the Ferrier rearrangement of acetylated and benzylated glycals. *Green Chem.* 2010;12:828-835. doi:10.1039/b921051b
107. Manvar A, Shah A. Subtle Mitsunobu couplings under super-heating: the role of high-throughput continuous flow and microwave strategies. *Org Biomol Chem.* 2014;12:8112-8124. doi:10.1039/c4ob01432d
108. Fletcher S. The Mitsunobu reaction in the 21st century. *Org Chem Front.* 2015;2:739-752. doi:10.1039/c5qo00016e
109. Swamy KCK, Kumar NNB, Balaraman E, Kumar KVPP. Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. *Chem Rev.* 2009;109:2551-2651.
110. Begum Z, Kishore C, Reddy VV, Reddy BVS. Aza-Ferrier rearrangement of glycals with amides promoted by molecular iodine. *Tetrahedron Lett.* 2014;55(44):6048-6050. doi:10.1016/j.tetlet.2014.09.023
111. Chassaing S, Bénétteau V, Pale P. When CuAAC "Click Chemistry" goes heterogeneous. *Catal Sci Technol.* 2016;6:923-957. doi:10.1039/c5cy01847a
112. Rodríguez DF, Moglie Y, Ramírez-Sarmiento CA, Singh SK, Dua K, Zacconi FC. Bio-

- click chemistry: a bridge between biocatalysis and click chemistry. *RSC Adv.* 2022;12(4):1932-1949. doi:10.1039/d1ra08053a
113. Taouai M, Abidi R, Garcia J, Siriwardena A, Benazza M. Synthesis of Unsymmetrical Thioethers Using an Uncommon Base-Triggered 1,5-Thiol Transfer Reaction of 1-Bromo-2-alkylthiolcarbonates. *J Org Chem.* 2014;79(22):10743-10751. doi:10.1021/jo5015504
 114. Alley SC, Jeffrey SC, Sussman D, Benjamin DR, Toki B, Burke J. Methods and compositions for making antibodies and antibody derivatives with reduced core fucosylation. Published online 2012.
 115. Györgydeák Z, Szilágyi L. Darstellung und ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung anomerer 6-Desoxyhexopyranosylazide. *Liebigs Ann Chem.* 1985;1985(1):103-112. doi:10.1002/jlac.198519850112
 116. Esteves AP, Rodrigues LM, Silva ME, et al. Synthesis and characterization of novel fluorescent N-glycoconjugates. *Tetrahedron.* 2005;61(36):8625-8632. doi:10.1016/j.tet.2005.07.006
 117. Kilchmann F, Marcaida MJ, Kotak S, et al. Discovery of a Selective Aurora A Kinase Inhibitor by Virtual Screening. *J Med Chem.* 2016;59:7188-7211. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00709
 118. Reisch J, Labitzke H. Pyrolyse des Furyl-(2)- und Thienyl-(2)-tert.-Butylcarbamats. *Arch Pharm (Wienheim).* 1977;310:840-846.
 119. Chankeshwara S V., Chakraborti AK. Copper(II) tetrafluoroborate as a novel and highly efficient catalyst for N-tert-butoxycarbonylation of amines under solvent-free conditions at room temperature. *Tetrahedron Lett.* 2006;47:1087-1091. doi:10.1016/j.tetlet.2005.12.044
 120. Koch DH, Hausdoerfer DE. Verfahren zur Darstellung von Alkylaminoanthrachinonen. Published online 1936:1-2.
 121. Thurston JT, Dudley JR, Kaiser DW, Hechenbleikner I, Schaefer FC, Holm-Hansen D. Cyanuric Chloride Derivatives. I. Aminochloro-s-triazines. *J Am Chem Soc.* 1951;73(7):2981-2983. doi:10.1021/ja01151a001
 122. Mosher HS, Whitmore FC. Heterocyclic Basic Compounds. II. Aminoalkylamino-s-triazines. *J Am Chem Soc.* 1945;67(4):662-664.
 123. Klotz P, Chatrenet B, Coppo M, Rousseau B, Goeldner M, Hirth C. Synthesis of a tri-tritiated heterobifunctional reagent, a potential tool in photoaffinity labeling technology. *J Label Compd Radiopharm.* 1991;29(2):149-155. doi:10.1002/jlcr.2580290205
 124. Denault GC, Marx PC, Takimoto HH. Energy of Combustion and Differential Thermograms of Organic Azides. *J Chem Eng Data.* 1968;13(4):514-516.
 125. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci.* 2021;22:12827. doi:10.3390/ijms222312827
 126. Twarużek M, Zastempowska E, Soszczyńska E, Ałtyn I. The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Acta Univ Lodz Folia Biol Oecologica.* 2018;14:23-32. doi:10.1515/fobio-2017-0006

127. Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, et al. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *SLAS Discov.* 2001;6(6):2472-5552.
128. Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J Mol Struct.* 2014;1077:101-113. doi:10.1016/j.molstruc.2014.03.009
129. Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc.* 2007;2(9):2212-2221. doi:10.1038/nprot.2007.321