



i pentachloru fosforu, która pozwala skrócić ich syntezę o jeden etap. Znalaziono błąd w opublikowanej metodzie syntezy kwasu 2-fenylotylofosfonowego – produktem tej reakcji jest kwas 2-fenyl-2-oksoetylofosfonowy. Żaden spośród badanych analogów kwasu (*E*)-cynamonowego nie okazał się silnym inhibitorem. Wiele podstawionych pochodnych kwasu (*E*)-cynamonowego jest natomiast substratami w biosyntezie *in vitro* podstawionych pochodnych (*S*)-fenyloalaniny. Wyniki obliczeń teoretycznych sposobu wiązania kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego do modelu amoniakolizy fenyloalaniny wskazują, że bardziej uprzywilejowany jest konformer z pseudoaksjalną grupą fosfonową. Badania kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego w cieple stałym, w roztworze i obliczenia dla cząsteczki izolowanej wskazują natomiast, że preferowana jest konformacja z grupą fosfonową w pozycji pseudoekwatorialnej. Inhibitor podczas przejścia z roztworu do miejsca aktywnego enzymu musi zatem zmienić konformację z pseudoekwatorialnej na pseudoaksjalną. Otrzymane wyniki obliczeń są zgodne z wynikami badań eksperymentalnych. Można przypuszczać, że z powodu zmiany konformacji cząsteczki kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy jest inhibitorem wolnowiążącym.

## Wykaz używanych skrótów

AIBN	– 2,2'-azobis(2-metylopropionitryl)
AIP	– kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy, <i>in vivo</i> oraz <i>in vitro</i> silny inhibitor amoniakolizy fenyloalaniny
Ala	– alanina
CA	– kwas ( <i>E</i> )-cynamonowy
C4H	– 4-hydroksylaza kwasu ( <i>E</i> )-cynamonowego (oksydoreduktaza z rodziny cytochromu P450)
CHS	– syntaza chalkonowa
4CL	– ligaza kwasu kumarowego: koenzymu A
COMT	– <i>O</i> -metylotransferaza estru koenzymu A i kwasu kawowego, której kofaktorem jest <i>S</i> -adenylometionina (SAM)
DMF	– dimetyloformamid
Gly	– glicyna
HAL	– amoniakolizacja histydyny, <i>EC</i> 4.3.1.3
$IC_{50}$	– stężenie inhibitora wywołujące hamowanie biosyntezy antocyjanin w 50%
$K_i$	– stała inhibicji enzymu
$K_m$	– stała Michaelisa
MIO	– 5-metyleno-3,5-dihydroimidazol-4-on, pochodna dehydroalaniny, elektrofilowa grupa prostetyczna amoniakolizy fenyloalaniny i histydyny
NBS	– <i>N</i> -bromosukcynoimid
PAL	– amoniakolizacja fenyloalaniny, <i>EC</i> 4.3.1.5
Ph	– grupa fenylova
PHT	– grupa ftaloilowa
pzc	– pod zmniejszonym ciśnieniem
SA	– kwas salicylowy
Ser	– seryna
THF	– tetrahydrofuran
t.pok.	– temperatura pokojowa, ok. 20 °C
t.w.	– temperatura wrzenia

## 1. Cel pracy

Amoniakoliza fenyloalaniny jest enzymem powszechnie występującym w roślinach. Enzym ten katalizuje reakcję eliminacji amoniaku z cząsteczki (*S*)-fenyloalaniny, prowadzącą do kwasu (*E*)-cynamonowego, substratu w biosyntezie lignin i różnorodnych związków o dużym znaczeniu dla roślin. W literaturze opisano dwa silne inhibitory amoniakolizy fenyloalaniny: kwas ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylopropionowy i kwas (*R*)-(-)-1-amino-2-fenyloetylofosfonowy. Kwas ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylopropionowy był używany przez wielu biochemików i fizjologów roślin jako narzędzie do badania metabolizmu i funkcji fizjologicznej związków wywodzących się z kwasu (*E*)-cynamonowego. Specyficzność działania tego inhibitora w warunkach *in vivo* była jednak kwestionowana.

Celem moich badań było zaprojektowanie i synteza związków o potencjalnych właściwościach inhibitorów amoniakolizy fenyloalaniny, a przede wszystkim znalezienie efektywnego *in vivo* inhibitora enzymu. Syntetyzowane analogi fenyloalaniny, fenyloglicyny i kwasu (*E*)-cynamonowego były badane pod tym kątem. Analizując otrzymane wyniki, próbowałem znaleźć relacje między budową a aktywnością inhibitorową. Szczególnie interesujące wydawało się określenie wpływu rodzaju grup funkcyjnych i rotacji wokół wybranego wiązania w cząsteczce inhibitora na jego aktywność, a także możliwość zastosowania go jako herbicydu.

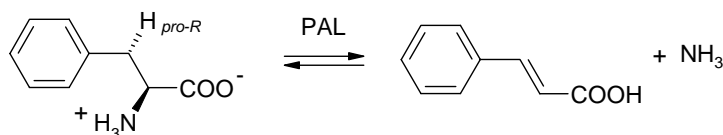
Badając wpływ zaprojektowanych i syntetyzowanych analogów fenyloalaniny na amoniakolizę fenyloalaniny, próbowałem również zweryfikować opisane w literaturze mechanizmy reakcji enzymatycznej.

Celem moich badań była również analiza struktury najsilniejszego ze znalezionych inhibitorów amoniakolizy fenyloalaniny, kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego zarówno w fazie stałej, w roztworze, jak i związanego z enzymem.

## 2. Przegląd literatury

### 2.1. Wprowadzenie

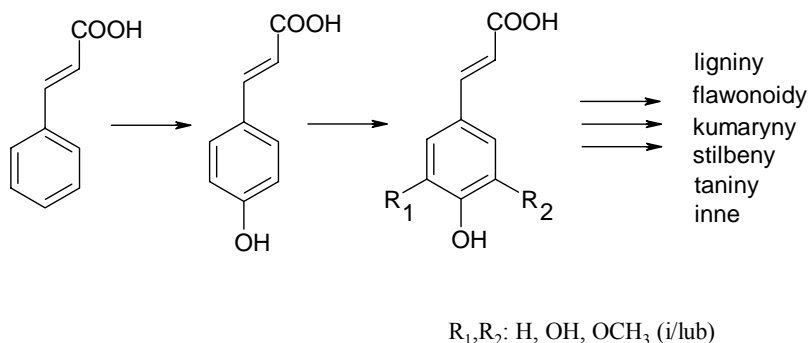
Amoniakoliza fenyloalaniny (PAL, EC 4.1.3.5) katalizuje reakcję eliminacji amoniaku z (*S*)-fenyloalaniny dającą, w rezultacie kwas (*E*)-cynamonowy [1–4]. Występowanie tego enzymu w siewkach jęczmienia odkryli Koukol i Conn [5]. Jest to enzym powszechnie występujący w świecie roślin, sporadycznie spotykany w drożdżach, a całkowicie nieznaną u zwierząt [6]. Niedawno doniesiono o występowaniu amoniakolizy fenyloalaniny w bakteriiach *Streptomyces maritimus* [7].



Schemat 1. Reakcja katalizowana amoniakolizą fenyloalaniny  
Scheme 1. Reaction catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase

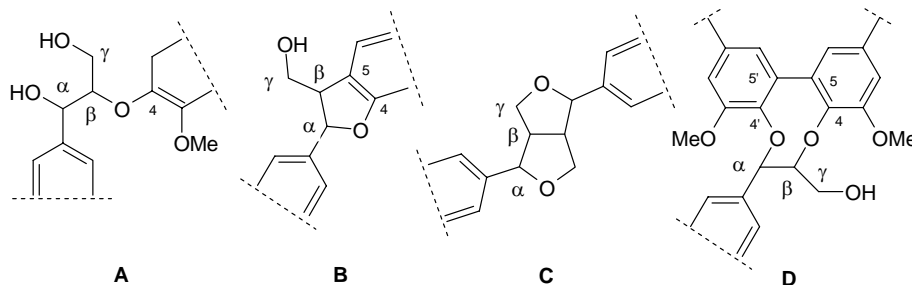
Konformacja grup odchodzących (protonu *pro-R* i amoniaku) w substracie amoniakolizy fenyloalaniny (schemat 1) jest naprzeciwległa [8], a zatem eliminację tę można nazwać *anti* [9, 10]. Substratem amoniakolizy fenyloalaniny może być także (*S*)-tyrozyna [11, 12]. PAL z roślin dwuliściennych (np. z pietruszki) ma zdecydowanie większą specyficzność substratową w stosunku do (*S*)-fenyloalaniny niż do (*S*)-tyrozyny, podczas gdy enzym z roślin jednoliściennych (np. z kukurydzy) może mieć porównywalną specyficzność substratową dla (*S*)-fenyloalaniny i (*S*)-tyrozyny.

Znaczenie tego enzymu wywodzi się z roli, jaką w roślinach odgrywa powstający podczas reakcji eliminacji kwas (*E*)-cynamonowy (CA). Jest on prekursorem wielu związków fenylopropanoidowych [1–3], takich jak np. ligniny, flawonoidy, kumaryny, stilbeny i kwas salicylowy (schemat 2). Spośród wymienionych metabolitów w największej ilości są biosyntetyzowane ligniny [13]. Stanowią one składnik budowy dojrzałej ściany komórki roślinnej i powstają z CA w kilkuetapowej syntezie. Kwas (*E*)-cynamonowy jest hydroksylowany kolejno w pozycjach 4', 3' i 5' pierścienia benzenowego, a następnie jego hydroksylowe pochodne są *O*-metylowane w pozycjach 3' i 5' [1]. Tak powstałe pochodne kwasu (*E*)-cynamonowego są redukowane



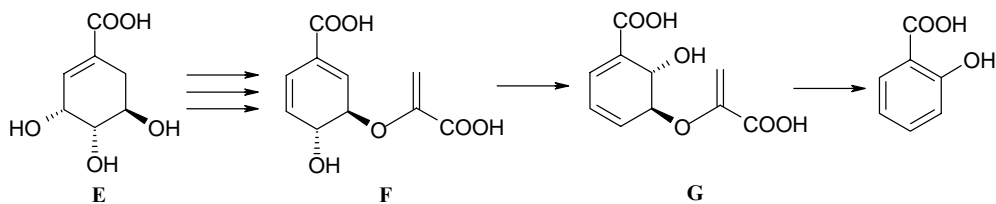
Schemat 2. Początkowe etapy metabolizmu kwasu (*E*)-cynamonowego u roślin [1]  
Scheme 2. Earlier steps of (*E*)-cinnamic acid biotransformation [1]

do pochodnych alkoholu (*E*)-cynamonowego, podstawionych grupą hydroksylową (w pozycjach 4', 3' i 5') lub metoksyłową (w pozycjach 3' i 5'). Pochodne te ulegają następnie enzymatycznej polimeryzacji rodnikowej do lignin [1]. Wykorzystanie różnych technik NMR w połączeniu z syntezą modelowych związków umożliwiło szczegółowe poznanie budowy lignin z kukurydzy i rzodkiewnika [14, 15]. W rzodkiewniku (roślina dwuliścienna) dominującymi strukturami (rys. 1) są:  $\beta$ -arylowy eter z wiązaniem  $\beta$ -O-4 (**A**), fenylokumarany z wiązaniem  $\beta$ -5 (**B**), resinole z wiązaniem  $\beta$ - $\beta$  (**C**) i cykliczny dwueter z wiązaniem 5-5/ $\beta$ -O-4,  $\alpha$ -O-4 (**D**) [14], pochodzące głównie od alkoholu (*E*)-4-hydroksi-3,5-dimetoksy-cynamonowego i alkoholu (*E*)-4-hydroksi-3-metoksy-cynamonowego.



Rys. 1. Fragmenty struktury lignin zidentyfikowane metodą spektroskopii NMR [14]  
Fig. 1. Parts of lignin structure determined by NMR spectroscopy [14]

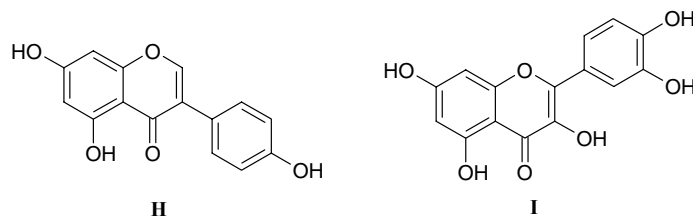
Inny metabolit, kwas salicylowy (SA), odgrywa prawdopodobnie rolę wtórnego przekaźnika informacji w procesie powstawania odporności rośliny na wirusy i bakterie [2]. Wyniki ostatnich badań wskazują, że SA może być także wytwarzany przez roślinę na innej drodze biosyntezy niż z kwasu (*E*)-cynamonowego (na schemacie 2 biosynteza SA jest ukryta pod słowem „inne”), a mianowicie z kwasu izochoryzmoowego (schemat 3) [16].



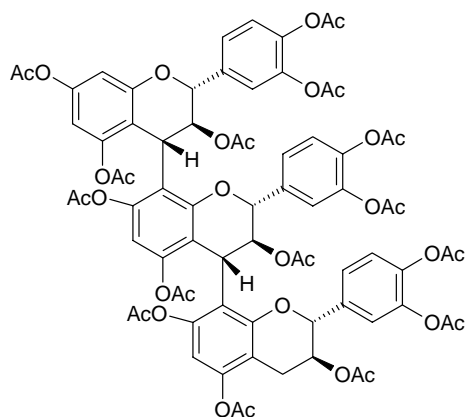
Schemat 3. Alternatywna droga biosyntezy kwasu salicylowego z kwasu izochoryzmowego (G) [16]  
(kwas szikimowy (E) i kwas chorizmowy (F))

Scheme 3. Alternative biosynthesis of salicylic acid from isochorismic acid (G) [16]  
(shikimic acid (E) and chorismic acid (F))

W ostatnich latach potwierdzono korzystny wpływ kilku metabolitów szlaku fenylpropanoidowego na zdrowie człowieka. Dobrym przykładem jest wpływ związków polifenolowych z czerwonego wina na zmniejszenie ryzyka wystąpienia choroby wieńcowej [17]. Dwa flawonoidy, genisteina i kwercetyna (rys. 2), wykazują właściwości inhibitorów kinazy cyklino-zależnej oraz są cytotoksyczne wobec modelowych komórek rakowych [18]. Inna pochodna flawonoidów z czerwonego wina, akutisimina A, jest inhibitorem topoizomerazy DNA [19].



Rys. 2. Wzory strukturalne genisteiny (H) i kwercetyny (I)  
Fig. 2. Structural formulae of genistein (H) and quercetin (I)



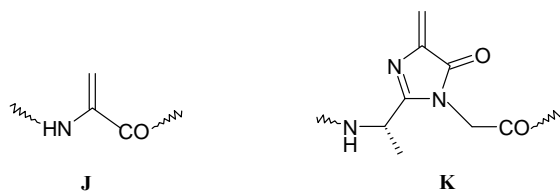
Rys. 3. Wzór (pentadekaacetyl)tricatechiny otrzymanej na drodze syntezy [21]  
Fig. 3. Structure of synthesized (pentadecaacetyl)tricatechin [21]

Otrzymano i opisano różne pochodne metabolitów szlaku fenylopropanoidowego [20, 21]. Opracowano np. metodę syntezy pochodnej trikatechiny (rys. 3), której widmo  $^1\text{H NMR}$  jest takie samo jak widmo pochodnej związku naturalnego [21].

## 2.2. Budowa amoniakolizy fenyloalaniny

Cząsteczka PAL jest homotetramerem. Podjednostka enzymu z pietruszki jest zbudowana z 714 aminokwasów, co odpowiada masie cząsteczkowej enzymu  $310\,420\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . PAL z różnych roślin charakteryzuje się różną masą cząsteczkową [6]. W chwili przygotowywania tego manuskryptu do druku ukazała się praca opisująca strukturę krystaliczną rekombinowanej amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki [22]. PAL jest białkiem o dominującej strukturze helikalnej – ponad połowa reszt aminokwasów tworzy  $\alpha$ -helisy. Enzym ma rzadko występującą elektrofilową grupę prostetyczną 5-metyleno-3,5-dihydroimidazol-4-onu (MIO, struktura **K** na rys. 4). W łańcuchu podjednostki białka można wyróżnić domenę zawierającą grupę prostetyczną, domenę miejsca aktywnego i domenę osłaniającą wejście do miejsca aktywnego. Grupa aminowa substratu jest prawdopodobnie wiązana w miejscu aktywnym przez dwie cząsteczki asparaginy ( $\text{Asn}^{260}$  i  $\text{Asn}^{384}$ ), podczas gdy anion grupy karboksylowej substratu znajduje się prawdopodobnie w pobliżu cząsteczki glutaminy ( $\text{Gln}^{348'}$ ) i argininy ( $\text{Arg}^{354'}$ ) sąsiedniej podjednostki oraz tyrozyny ( $\text{Tyr}^{110}$ ) z tej samej podjednostki [22]. Autorzy pracy twierdzą, że struktura PAL ewolucyjnie wywodzi się od prostszej struktury amoniakolizy histydyny.

Nie są znane warunki dysocjacji cząsteczki PAL na podjednostki i ponownej asocjacji do aktywnego katalitycznie tetrameru. W świetle obecnej wiedzy na temat budowy PAL wydaje się mało prawdopodobne, aby podjednostka była w stanie zachować aktywność enzymatyczną ze względu na zewnętrzne położenie bardzo reaktywnej grupy prostetycznej MIO; w tetramerze grupy prostetyczne zajmują położenie wewnątrz cząsteczki enzymu [22].



Rys. 4. Wzory strukturalne grupy prostetycznej amoniakolizy fenyloalaniny według Hansona i Havira (**J**) [29] oraz Réteya i in. (**K**) [33]

Fig. 4. Structural formulae of prosthetic group of phenylalanine ammonia-lyase according to Hanson and Havir (**J**) [29], and Rétey et al. (**K**) [33]

Przestrzenną budowę amoniakolizy fenyloalaniny przedstawiono na rys. 5a i b. Przed poznaniem struktury krystalicznej amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki dostępny był trójwymiarowy model miejsca aktywnego enzymu z pietruszki [23],

otrzymany techniką modelowania molekularnego, wykorzystujący homologię tego enzymu z amoniakoliazą (*S*)-histydyny [24].

Ostatnio opublikowano strukturę amoniakoliazы fenyloalaniny z drożdży (*Rhodospiridium torulides*) otrzymaną za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej [25]. Autorzy pracy podkreślają obecność w cząsteczce enzymu sześciu fragmentów polipeptydowych przyjmujących kształt helisy, obdarzonych momentem dipolowym i skierowanych do centrum aktywnego. Otrzymana struktura trójwymiarowa najbardziej przypomina strukturę amoniakoliazы histydyny (HAL) z bakterii (*Pseudomonas putida*) [24].

### 2.3. Mechanizm reakcji katalizowanej przez amoniakoliazę fenyloalaniny

Reakcje eliminacji wymagają udziału dobrej grupy odchodzącej i silnej zasady lub podwyższonej temperatury [9, 10]. Nasuwa się zatem pytanie o mechanizm eliminacji amoniaku z cząsteczki (*S*)-fenyloalaniny. Z nadzieją na głębsze poznanie mechanizmu reakcji różni autorzy badali kinetyczne efekty izotopowe reakcji katalizowanej amoniakoliazą fenyloalaniny, pierwszo- i drugorzędowe ze znaczną izotopowo (*S*)-fenyloalaniną lub 3-(1,4-cykloheksadienyl)alaniną [26–28]. Na podstawie otrzymanych wyników nie można zaproponować jednej drogi reakcji, ale są one przydatne do analizy różnych propozycji mechanizmów reakcji.

Duży postęp w badaniach mechanizmu reakcji katalizowanej amoniakoliazą fenyloalaniny stanowiło odkrycie niezbędnej w katalizie grupy prostetycznej o charakterze elektrofilowym [29]. Hanson i Havir przypisali tej grupie strukturę reszty dehydroalaniny (struktura **J** na rys. 4) i zaproponowali jej rolę przejściowego akceptora grupy aminowej (*S*)-fenyloalaniny w reakcji typu addycja Michaela.

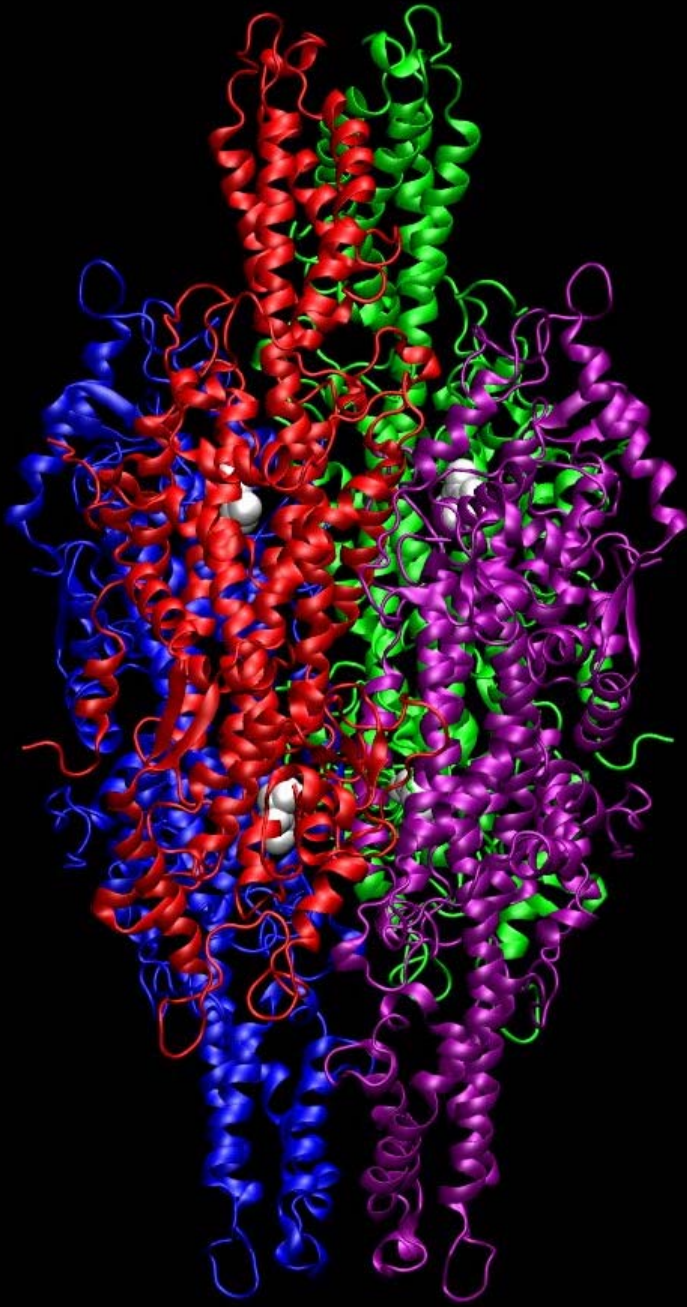
Schuster i Rétey [30] w reakcji katalizowanej przez amoniakoliazę fenyloalaniny przypisali elektrofilowej reszcie dehydroalaniny inną rolę – udział w odwracalnej reakcji typu Friedela–Craftsa z pierścieniem benzenowym (*S*)-fenyloalaniny. Tę hipotezę autorzy oparli na wynikach doświadczeń z (*S*)-4-nitrofenyloalaniną jako substratem i enzymem zmutowanym punktowo (bez grupy prostetycznej). Zaproponowany przez autorów mechanizm reakcji katalitycznej tłumaczył zwiększenie kwasowości protonów w pozycji C3 produktu przejściowego reakcji (karbokation w pozycji sąsiedniej do C3).

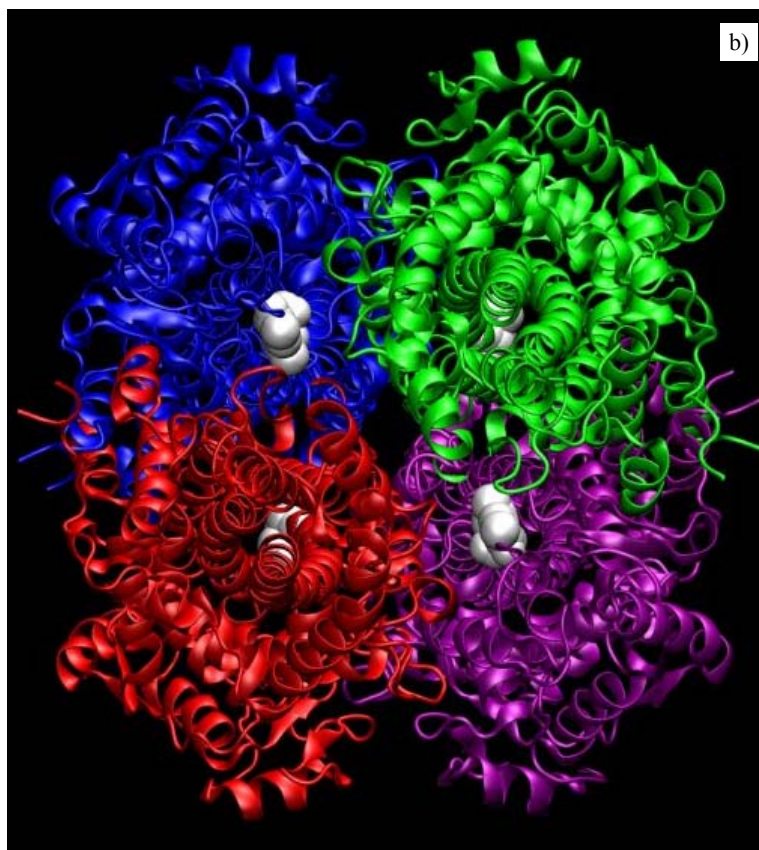
W ostatnich dwudziestu latach wielokrotnie badano i porównywano skład aminokwasowy amoniakoliazы fenyloalaniny z różnych roślin oraz skład amoniakoliazы fenyloalaniny ze składem amoniakoliazы histydyny (HAL). Amoniakoliazа histydyny katalizuje reakcję eliminacji amoniaku z (*S*)-histydyny i występuje powszechnie u bakterii i zwierząt. Stwierdzono duży stopień podobieństwa pomiędzy PAL i HAL. Przełomowym osiągnięciem w badaniach amoniakoliazы histydyny było poznanie struktury przestrzennej rekombinowanego HAL z *Pseudomonas putida* metodą rentgenograficznej analizy strukturalnej [24]. Przeprowadzone badania struktury HAL umożliwiły zaproponowanie nowej struktury elektrofilowej grupy prostetycznej [24].



Przypisano jej strukturę 5-metyleno-3,5-dihydroimidazol-4-onu (MIO, struktura **K** na rys. 4).

a)



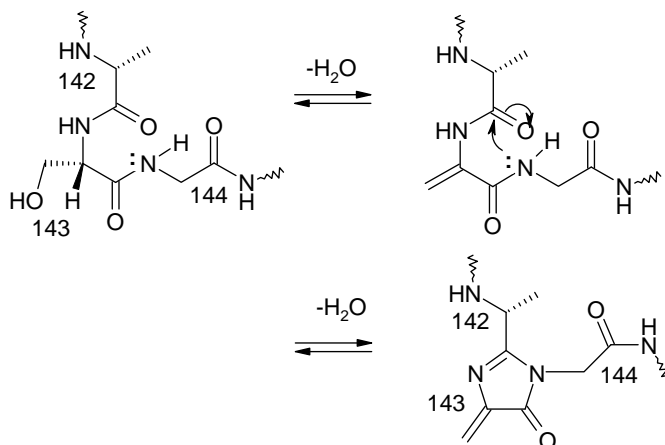


Rys. 4. Widok z boku (a) i z góry (b) przestrzennej budowy amoniakolizazy z pietruszki otrzymany na podstawie rentgenowskiej analizy strukturalnej (Protein Data Bank, numer rekordu 1W27) za pomocą programu VMD. Cztery podjednostki tetramery zaznaczono różnymi kolorami, MIO zaznaczono kolorem białym

Fig. 4. End (a) and top (b) views of three-dimensional structure of parley phenylalanine ammonia-lyase (Protein Data Bank, record No. 1W27) generated by the VMD software package. The four subunits are distinguished by different colours. MIO is coded by white

Zaproponowano powstawanie MIO z fragmentu enzymu w następującej sekwencji reakcji (prawdopodobnie wymuszonej konformacją białka): dehydratacja (reszty seryny) i kondensacja (addycja grupy NH glicyny do grupy CO alaniny i kolejna dehydratacja) (schemat 4) lub w kolejności odwrotnej, tzn. najpierw kondensacja, a następnie dehydratacja. Według obliczeń metodą dynamiki molekularnej [31], polegających na szacowaniu zmian energii swobodnej dla alternatywnych dróg przebiegu reakcji modyfikacji amoniakolizazy histydyny, droga przedstawiona na schemacie 4 wymaga mniejszego nakładu energii, jest zatem preferowana.

Strukturę 5-metyleno-3,5-dihydroimidazol-4-onu zaproponowano także jako grupę prostetyczną aminomutazy tyrozyny [32]. Enzym ten katalizuje transformację (*S*)-tyrozyny do (*S*)- $\beta$ -tyrozyny podczas biosyntezy związku oznaczonego symbolem C-1027.



Schemat 4. Proponowana sekwencja reakcji fragmentu Ala<sup>142</sup>-Ser<sup>143</sup>-Gly<sup>144</sup> amoniakolizy histydyny prowadząca do otrzymania grupy prostetycznej MIO [31]  
 Scheme 4. Suggested sequence of reactions of a fragment histidine ammonia-lyase (Ala<sup>142</sup>-Ser<sup>143</sup>-Gly<sup>144</sup>) leading to the prosthetic group MIO [31]

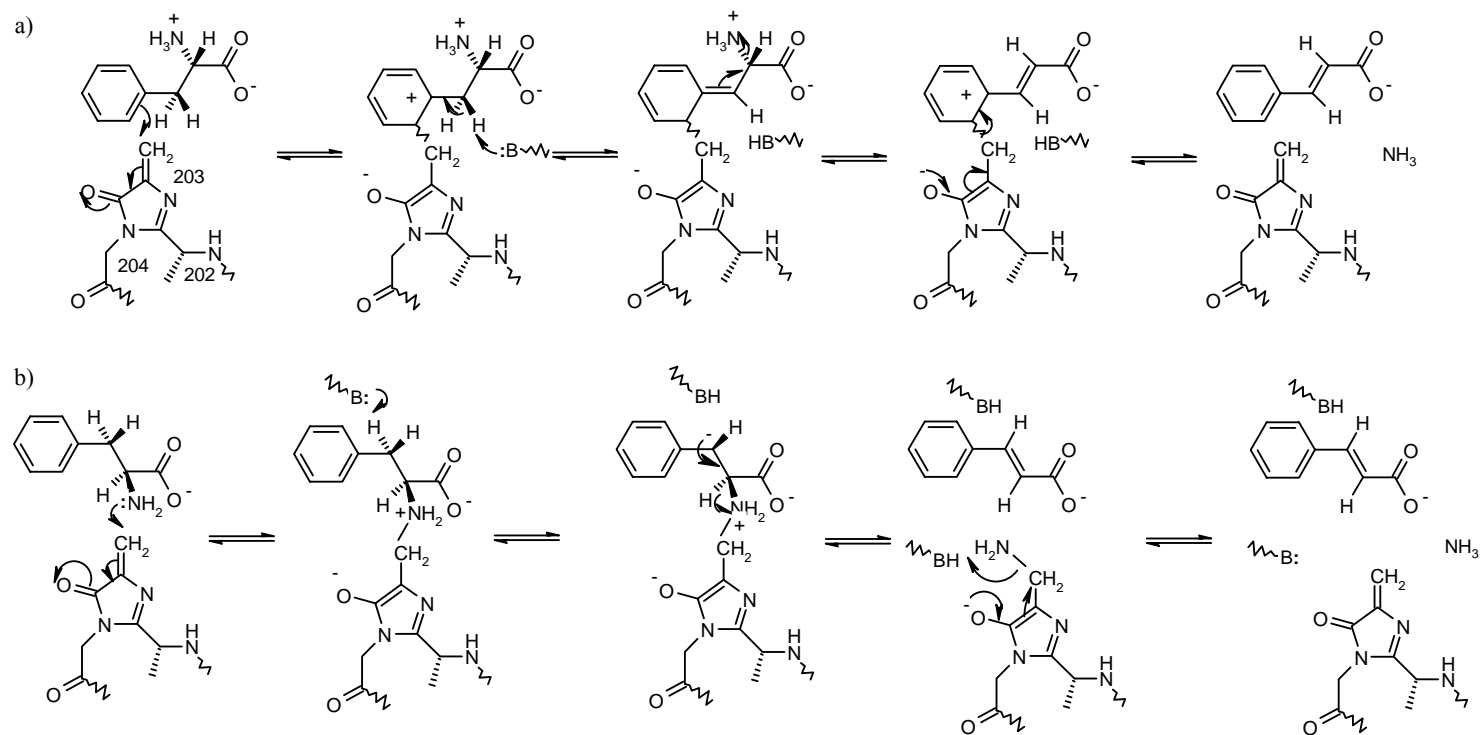
Różnicowe badania spektroskopowe w ultrafiolecie HAL, PAL i odpowiednio dobranych rekombinowanych PAL (z zamienionym jednym aminokwasem) oraz badania struktury HAL [24] sugerowały obecność reszty 5-metyleno-3,5-dihydroimidazol-4-onu jako grupy prostetycznej dla amoniakolizy fenyloalaniny [33]. Badania struktury krystalicznej amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki [22] i z drożdży [25] ostatecznie potwierdzają.

Jeden z izoenzymów amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki został poddany ekspresji w *Escherichia coli* [34, 35] z dużą wydajnością. Dzięki temu, enzym ten mógł być przedmiotem badań krystalograficznych [22]. Wydaje się, że może to być metoda otrzymywania większych ilości rekombinowanego PAL.

W literaturze można znaleźć dwie propozycje mechanizmu reakcji eliminacji amoniaku z (*S*)-fenyloalaniny katalizowanej amoniakolizą fenyloalaniny. Różnią się one funkcją, jaką pełni grupa prostetyczna MIO (schemat 5a i b). Na schemacie 5a przedstawiono sekwencję reakcji z udziałem MIO, którego celem jest pomoc w usunięciu grupy amoniowej w produkcie przejściowym reakcji typu Friedela-Craftsa [36, 37]. Sekwencja reakcji przedstawiona na schemacie 5b uwzględnia udział MIO w reakcji typu Michaela [25]. Przebieg reakcji jest podobny do proponowanego przez Hansona i Havira [29].

Obie hipotezy mają swoje słabe strony. Mechanizm reakcji przedstawiony na schemacie 5a może budzić zastrzeżenia ze względu na dużą barierę energetyczną etapu dearomatyzacji pierścienia benzenowego (*S*)-fenyloalaniny. Hipoteza zawarta zaś w mechanizmie reakcji przedstawionym na schemacie 5b nie wyjaśnia, w jaki sposób w procesie enzymatycznej katalizy może być zrealizowany etap oderwania protonu od

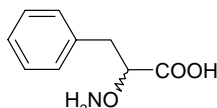
węgla C3 substratu. Obie propozycje odgrywają stymulującą rolę w poszukiwaniu pełniejszego opisu i rozumienia przebiegu tej reakcji enzymatycznej.



Schemat 5. Hipotetyczny mechanizm reakcji eliminacji katalizowanej PAL według: a) Réteya i in. [36, 37], b) Calabrese i in. [25]  
 Scheme 5. Hypothetical mechanism of elimination of phenylalanine ammonia-lyase according to: a) Rétey et al. [36, 37], b) Calabrese et al. [25]

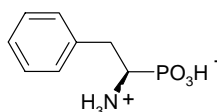
## 2.4. Inhibitory amoniakolizy fenyloalaniny

Związki chemiczne hamujące reakcje chemiczne bądź enzymatyczne nazywają się inhibitorami. Hamowanie reakcji enzymatycznej może polegać na konkurencji między substratem a inhibitorem o to samo miejsce w enzymie. Istotnym elementem w oddziaływaniach między inhibitorem a enzymem jest grupa farmakoforowa – część cząsteczki inhibitora, która zawiera grupy funkcyjne bezpośrednio oddziałujące z miejscem aktywnym enzymu. Celem syntezy inhibitorów jest zahamowanie reakcji enzymatycznej.



Rys. 6. Wzór strukturalny kwasu (±)-2-aminooksy-3-fenylpropionowego  
Fig. 6. Structural formula of (±)-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid

Poszukiwanie nowych herbicydów w dużej mierze polega na molekularnym modelowaniu, syntezie i badaniu inhibitorów enzymów ważnych szlaków metabolicznych roślin [38]. Ze względu na to, że biosynteza związków fenylpropanoidowych nie przebiega w organizmach zwierząt, przed wielu laty zaproponowano, aby amoniakoliza fenyloalaniny była enzymem docelowym w projektowaniu nowego herbicydu [39]. Otrzymano wiele inhibitorów tego enzymu. Spośród wszystkich zbadanych związków najsilniejszym inhibitorem PAL i syntezy antocyjanin do 1992 roku był kwas (±)-2-aminooksy-3-fenylpropionowy [40] (analog substratu zawierający grupę aminooksyłową, rys. 6), który biosyntezę antocyjanin ( $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ ) hamował znacznie słabiej niż amoniakolizę ( $K_i = 0,0014 \mu\text{M}$ ). Może to sugerować oddziaływanie *in vivo* kwasu (±)-2-aminooksy-3-fenylpropionowego z innymi enzymami. Domniemanym miejscem działania tego inhibitora mogą być enzymy zależne od fosforanu pirydoksalu. Innym silnym inhibitorem omawianego enzymu był w tych latach kwas (*R*)-(-)-1-amino-2-fenyletylofosfonowy [41, 42] (rys. 7), analog (*S*)-fenyloalaniny zawierający grupę fosfonową. Wartości stałych inhibicji dla tego inhibitora wynoszą:  $IC_{50} = 50 \mu\text{M}$  i  $K_i = 1,5 \mu\text{M}$  [42].



Rys. 7. Wzór strukturalny kwasu (*R*)-(-)-1-amino-2-fenyletylofosfonowego  
Fig. 7. Structural formula of (*R*)-(-)-1-amino-2-phenylethylphosphonic acid

Badania inhibicji przeprowadzono w porównywalnych warunkach jak dla kwasu (±)-2-aminooksy-3-fenylpropionowego.

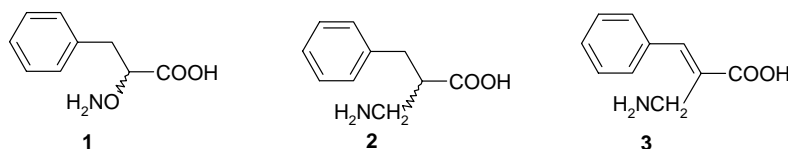
### 3. Badania własne

#### 3.1. Synteza analogów fenyloalaniny

##### 3.1.1. Analogi kwasu ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylopropionowego

Spośród licznych analogów fenyloalaniny znanych w literaturze moją uwagę zwrócił kwas ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylopropionowy **1** ze względu na to, że jest on bardzo silnym inhibitorem PAL. Silne *in vitro* inhibitorowe właściwości tego związku w stosunku do amoniakolizazy fenyloalaniny odkryli Amrhein i Gödeke [40]. Syntezę kwasu (*S*)-(-)-2-aminooksy-3-fenylopropionowego z (*R*)-(+)-fenyloalaniny opisał Malcolm i Morley [43].

Analiza porównawcza inhibitora i specjalnie zaprojektowanych analogów może pomóc w odkryciu prawdopodobnego sposobu hamowania reakcji przez inhibitor. Postanowiłem więc otrzymać związki podobne pod względem budowy do kwasu ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylopropionowego, a następnie zbadać ich wpływ na amoniakolizazę fenyloalaniny. W tym celu otrzymałem kwas ( $\pm$ )-2-aminometylo-3-fenylopropionowy (**2**) [44], analog inhibitora **1**, zawierający izosteryczną grupę metylenową zamiast atomu tlenu.



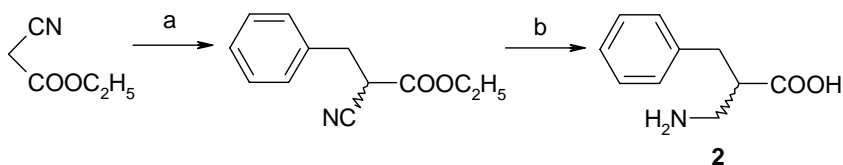
Rys. 8. Kwas ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylopropionowy (**1**) oraz jego analogi **2** i **3** [44]

Fig. 8. ( $\pm$ )-2-Aminoxy-3-phenylpropionic acid and its analogues **2** and **3** [44]

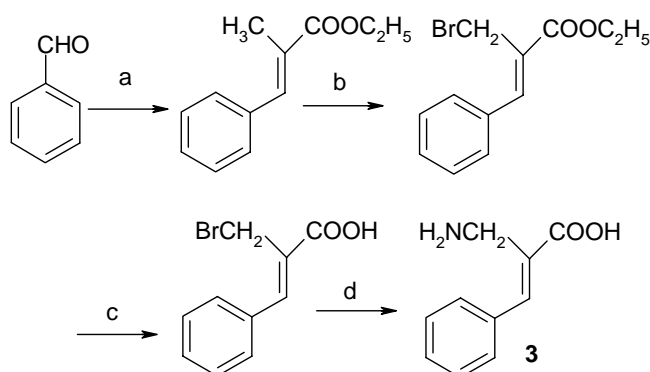
Otrzymałem też kwas (*E*)-2-aminometylo-3-fenyloakrylowy (**3**) [44], który można traktować jako usztywniony analog związków **1** i **2** (rys. 8). Kwas ( $\pm$ )-2-aminometylo-3-fenylopropionowy (**2**) otrzymałem z cyjanooctanu etylu według schematu 6.

Kwas (*E*)-2-aminometylo-3-fenyloakrylowy (**3**) otrzymałem z aldehydu benzoowego i 2-(dietoksyfosforylo)propionianu etylu poprzez (*E*)-2-metylo-3-fenyloakrylan etylu jako produkt reakcji Hornera–Wadswortha–Emmons (schemat 7) [44].



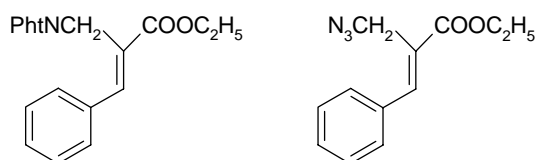


Schemat 6. Synteza kwasu ( $\pm$ )-2-aminometylo-3-fenylpropionowego (**2**) [44]:  
 a) aceton,  $C_6H_5CH_2Br$ ,  $K_2CO_3$ ,  $Bu_4N^+Br^-$ , 50%; b) (i)  $H_2$ , Ni-Raney, (ii) hydroliza, 39%  
 Scheme 6. Synthesis of ( $\pm$ )-2-aminomethyl-3-phenylpropionic acid (**2**) [44]:  
 a) acetone,  $C_6H_5CH_2Br$ ,  $K_2CO_3$ ,  $Bu_4N^+Br^-$ , 50%; b) (i)  $H_2$ , Raney-Ni, (ii) hydrolysis, 39%



Schemat 7. Synteza kwasu (*E*)-2-aminometylo-3-fenylakrylowego (**3**) [44]:  
 a)  $CH_3CH[P(O)(OC_2H_5)_2]COOC_2H_5$ , THF,  $t-C_4H_9OK$ , zawartość izomeru *Z* < 5%, 80%;  
 b) NBS, 84%; c) hydroliza 48% HBr, 80%; d)  $CH_3OH-NH_3$ , 50%  
 Scheme 7. Synthesis of (*E*)-2-aminomethyl-3-phenylacrylic acid (**3**) [44]:  
 a)  $CH_3CH[P(O)(OC_2H_5)_2]COOC_2H_5$ , THF,  $t-C_4H_9OK$ , content of isomer *Z* < 5%, 80%;  
 b) NBS, 84%; c) hydrolysis 48% HBr, 80%; d)  $CH_3OH-NH_3$ , 50%

Syntezy aminokwasu **3** poprzez ftalimidową pochodną lub azydek (rys. 9) były mniej wydajne w porównaniu z reakcją przedstawioną na schemacie 7.

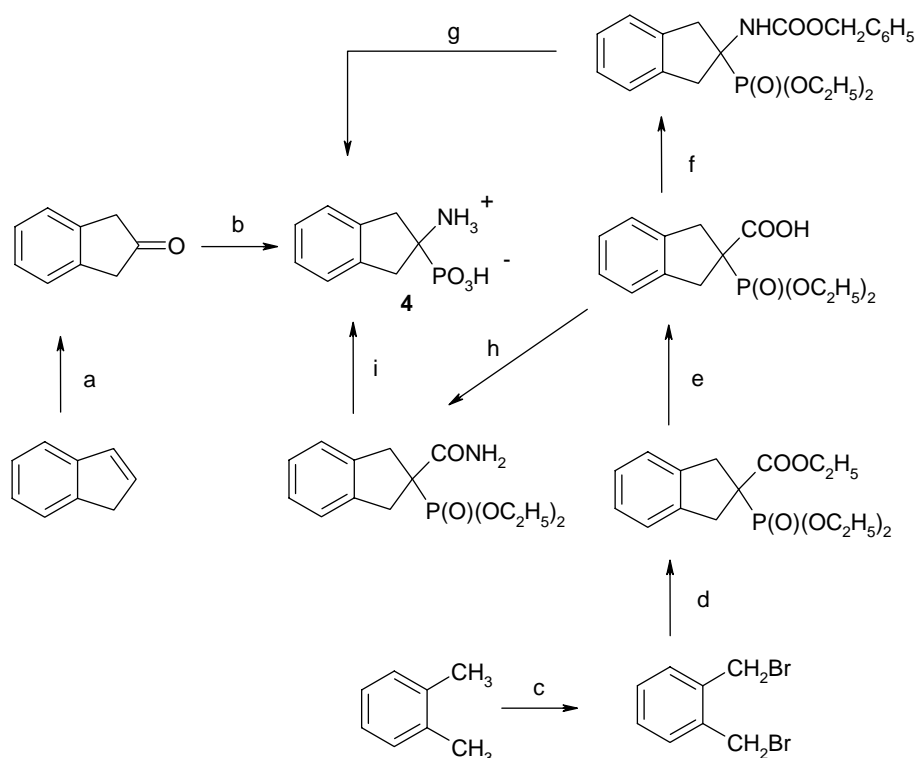


Rys. 9. Inne produkty pośrednie otrzymane w syntezie kwasu (*E*)-2-aminometylo-3-fenylakrylowego [44]  
 Fig. 9. Other intermediate products during (*E*)-2-aminomethyl-3-phenylacrylic acid [44]

Aminokwasy **2** i **3** nie były do tej pory opisane w literaturze [44]. Analiza właściwości inhibitorowych tych związków oraz dane literaturowe pozwoliły sformułować hipotezę dotyczącą przyczyny silnych właściwości inhibitorowych kwasu ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylpropionowego (**1**). Szczegółowe omówienie właściwości inhibitorowych znajduje się w rozdz. 3.4.1.1.

### 3.1.2. Konformacyjnie sztywne analogi kwasu (*R*)-1-amino-2-fenylotylofosfonowego

Do zainteresowania się fosfonowymi analogami (*S*)-fenyloalaniny skłoniły mnie znane inhibitorowe właściwości kwasu (*R*)-(-)-1-amino-2-fenylotylofosfonowego [41, 42]. Celem było otrzymanie konformacyjnie sztywnego inhibitora o budowie podobnej do fosfonowego analogu fenyloalaniny; postanowiłem zsyntetyzować kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (**4**, AIP, schemat 8) [45]. Z przeglądu metod syntezy kwasów 1-aminoalkilofosfonowych wynikało, że dogodnym substratem w syntezie



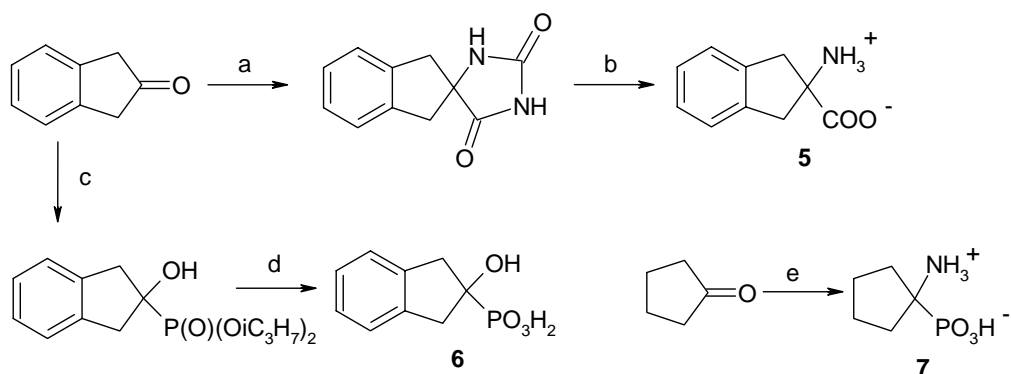
Schemat 8. Synteza kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (**4**) [45]: a) 88% HCOOH-30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (i), 7% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 55-75% (ii); b) lodowaty CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>COCl-PCl<sub>3</sub> (i), stęż. HCl-H<sub>2</sub>O, ogrzewanie (ii), tlenek propylenu, 7-25% (iii); c) NBS, 60-70%; d) Et<sub>2</sub>O-EtOH-EtONa, fosfonoacetan trietylu, 68% lub toluen-fosfonoacetan trietylu-(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>-NaOH (stały), 30-60% e) H<sub>2</sub>O-EtOH, NaOH, 66%; f) toluen-(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N-(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>2</sub>P(O)N<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OH, 70%; g) H<sub>2</sub>O-HCl, 60%; h) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-SOCl<sub>2</sub>-DMF (i), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, 65% (ii); i) 0° C, H<sub>2</sub>O-NaOBr (i), HCl-H<sub>2</sub>O (ii), CH<sub>3</sub>OH, tlenek propylenu, 36% (iii)

Scheme 8. Synthesis of 2-aminoindane-2-phosphonic acid (**4**) [45]: a) 88% HCOOH-30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (i), 7% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 55-75% (ii); b) glacial CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>COCl-PCl<sub>3</sub> (i), conc. HCl-H<sub>2</sub>O, heating (ii), 1,2-epoxypropane 7-25% (iii); c) NBS, 60-70%; d) Et<sub>2</sub>O-EtOH-EtONa, triethyl phosphonoacetate, 68% or toluene-triethyl phosphonoacetate-(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>-NaOH(solid), 30-60% e) H<sub>2</sub>O-EtOH, NaOH, 66%; f) toluene-(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N-(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>2</sub>P(O)N<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OH, 70%; g) H<sub>2</sub>O-HCl, 60%; h) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-SOCl<sub>2</sub>-DMF (i), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, 65% (ii); i) 0° C, H<sub>2</sub>O-NaOBr (i), HCl-H<sub>2</sub>O (ii), CH<sub>3</sub>OH, 1,2-epoxypropane, 36% (iii)

związku **4** mógł być 2-indanon, który można w prosty sposób otrzymać z indenu (schemat 8). Alternatywnym substratem w syntezie cyklicznego analogu fenyloalaniny **4** mógł być *o*-ksylen, z którego otrzymałem 1,2-bis(bromometylo)benzen, którym alkilowałem fosfonooctan trietylu (schemat 8). Syntezę związku **4** przedstawiono na schemacie 8, a szczegóły wykonania syntezy opisano w publikacjach [45, 46]. Sposób otrzymania kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego jest także przedmiotem patentu [47]. Kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (**4**) jest wyjątkowo silnym inhibitorem *in vivo* amoniakolizy fenyloalaniny [45]. Więcej informacji na ten temat umieszczono w podrozdziale 3.4.1.1.

AIP (**4**) oraz pozostałe produkty pośrednie (z wyjątkiem 2-indanonu i 1,2-bis(bromometylo)benzenu) przedstawione na schemacie 8 były związkami dotąd nieopisanymi w literaturze.

W celu zbadania, jak zmiana fragmentów struktury cząsteczki inhibitora **4** wpływa na oddziaływanie z enzymem, otrzymałem dodatkowo następujące związki: kwas 2-aminoindano-2-karboksylowy (**5**), kwas 2-hydroksiindano-2-fosfonowy (**6**) i kwas 1-aminocyklopentano-1-fosfonowy (**7**). Kwas 2-hydroksiindano-2-fosfonowy (**6**) oraz jego ester diizopropylowy były nowymi związkami. Metody syntezy otrzymanych związków przedstawiono na schemacie 9.

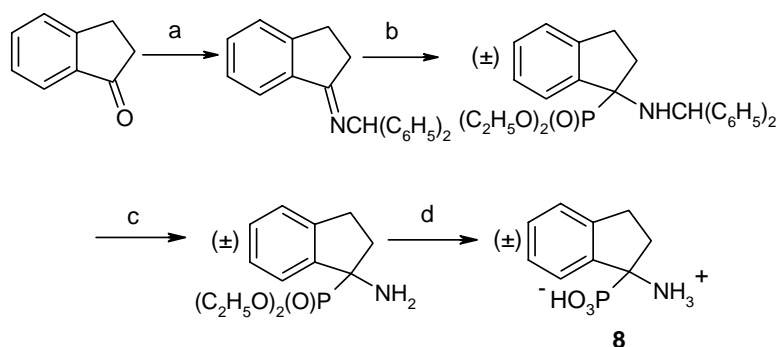


Schemat 9. Synteza związków **5**, **6** i **7** [45]: a)  $\text{H}_2\text{O}-\text{EtOH}-(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3-\text{NaCN}$ , 90%; b)  $\text{H}_2\text{O}-\text{Ba}(\text{OH})_2$ , 30%; c) fosfonian diizopropylu- $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 30%; d)  $\text{HCl}-\text{CH}_3\text{COOH}$ , 77%; e) lodowaty  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_3\text{COCl}-\text{PCl}_3$ (i),  $\text{H}_2\text{O}-\text{HCl}$ , 25% (ii)  
 Scheme 9. Synthesis of compounds **5**, **6** i **7** [45]: a)  $\text{H}_2\text{O}-\text{EtOH}-(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3-\text{NaCN}$ , 90%; b)  $\text{H}_2\text{O}-\text{Ba}(\text{OH})_2$ , 30%; c) diisopropyl phosphite- $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 30%; d)  $\text{HCl}-\text{CH}_3\text{COOH}$ , 77%; e) glacial  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_3\text{COCl}-\text{PCl}_3$  (i),  $\text{H}_2\text{O}-\text{HCl}$ , 25% (ii)

Celem kolejnej syntezy był kwas ( $\pm$ )-1-aminoindano-1-fosfonowy (**8**, 1-AIP), aminokwas o takim samym szkielecie węglowym jak kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (**4**). Synteza 1-AIP (**8**) okazała się zadaniem trudniejszym, niż to się wydawało podczas planowania badań. Amidoalkilowanie trichlorku fosforu pochodną otrzymaną z 1-indanonu w warunkach opisywanych w literaturze dla tego typu substratów [48, 49], nie doprowadziło do oczekiwanego aminokwasu **8**. Ostatecznie znaleziono

leżono sposób syntezy kwasu ( $\pm$ )-1-aminoindano-1-fosfonowego (**8**) z 1-indanonu [50, 51]. Kluczowym etapem tej syntezy okazało się otrzymanie krystalicznej zasady Schiffa z 1-indanonu i benzhydryloaminy (podobna reakcja 1-indanonu z benzyloaminą nie prowadziła do otrzymania *N*-1-indanylidobenzhydryloaminy zdolnej do reagowania z fosfonianem dietylu i w rezultacie nie dawała spodziewanego ( $\pm$ )-1-benzyloaminoindano-1-fosfonianu dietylu). Kwaśna hydroliza ( $\pm$ )-1-benzhydryloaminoindano-1-fosfo-

nianu dietylu, otrzymanego w wyniku fosfonylowania *N*-1-indanylidobenzhydryloaminy, prowadziła do rozpadu na 1-indanon, kwas fosforowy(III) i jego estry oraz soli benzhydryloaminy zamiast oczekiwanego kwasu 1-aminoindano-1-fosfonowego [50–52]. Podobnie zachowywał się ( $\pm$ )-1-benzhydryloamino-1-(9'-antranilo)-metylofosfonian dietylu. Wydaje się, że przyczyną rozpadu tych dwóch fosfonianów mogą być czynniki steryczne i elektronowe, w wyniku których współzawodnictwo o miejsce protonowania wygrywa tlen grupy fosforylowej z azotem drugorzędowej grupy aminowej, osłoniętej dwoma dużymi podstawnikami [52, 53]. Jeśli jednak usunie się wodorolitycznie osłonę benzohydrylową z atomu azotu i ( $\pm$ )-1-aminoindano-1-fosfonian dietylu podda się kwaśnej hydrolizie, to otrzymuje się kwas ( $\pm$ )-1-aminoindano-1-fosfonowy (**8**). W hydrolizacie nie obserwuje się produktów rozpadu związku **8** (kwasu fosforowego(III) i jego estrów) [50, 53]. Opisaną metodę syntezy kwasu ( $\pm$ )-1-aminoindano-1-fosfonowego (**8**) przedstawiono na schemacie 10. Podobny sposób postępowania z powodzeniem zastosowano do syntezy kwasu 1-aminocyklopentano-1-fosfonowego z cyklopentanonu [50, 53].



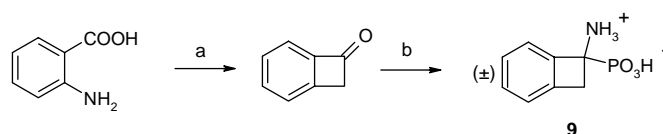
Schemat 10. Synteza kwasu ( $\pm$ )-1-aminoindano-1-fosfonowego (**8**) [50, 51]: a)  $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{CHNH}_2$ , 72%; b) fosfonian dietylu, 70%; c)  $\text{H}_2$ , 95% etanol, 10% Pd/C, 41%; d)  $\text{H}_2\text{O}-\text{HCl}$ , 37%

Scheme 10. Synthesis of ( $\pm$ )-1-aminoindane-1-phosphonic acid (**8**) [50, 51]: a)  $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{CHNH}_2$ , 72%; b) diethyl phosphite, 70%; c)  $\text{H}_2$ , 95% ethanol, 10% Pd/C, 41%; d)  $\text{H}_2\text{O}-\text{HCl}$ , 37%

Niepowodzeniem zakończyły się natomiast próby otrzymania kwasów 1-aminocykloalkano-1-fosfonowych z 1-oksobenzocyclobutenu, 3,4-dihydro-1(2*H*)-naftalenu ( $\alpha$ -tetralonu) i 1-benzosuberonu (1-benzocycloheptanonu). Wydaje się, że krytycznym etapem tej syntezy jest powstawanie zasady Schiffa, która może ulegać tautome-

ryzacji do enaminy. Ta ostatnia nie jest substratem w syntezie kwasu 1-aminocykloalkano-1-fosfonowego. Kwas ( $\pm$ )-1-aminoindano-1-fosfonowy (**8**) jest słabym inhibitorem PAL (por. tabela 1).

W celu zbadania wpływu wielkości pierścienia na aktywność inhibitorową kwasów aminobenzocykloalkanofosfonowych otrzymałem kwas ( $\pm$ )-1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowy (**9**) (schemat 11) oraz kwas ( $\pm$ )-2-amino-1,2,3,4-tetrahydronaftaleno-2-fosfonowy (**10**) (schemat 12). Syntezę racemicznego kwasu 1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowego (**9**) przeprowadziłem, wychodząc z kwasu antranilowego [54-55]. Z 1-oksobenzocyklobutenu otrzymałem odczynnik amidoalkilujący – trichlorek fosforu [56]. Przebieg syntezy kwasu ( $\pm$ )-1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowego (**9**) przedstawiono na schemacie 11. Otrzymywanie związku **9** opisałem w rozdz. 4.1.

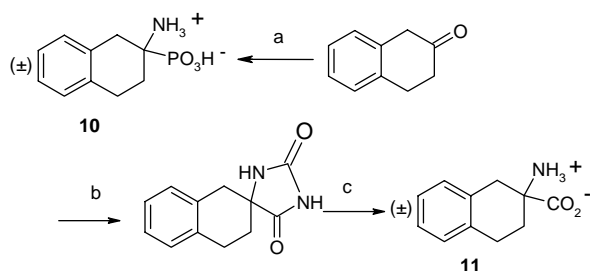


Schemat 11. Synteza kwasu ( $\pm$ )-1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowego (**9**):

- a) THF,  $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{ONO}$ , [54] (i),  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ , benzenodiazoniowy-2-karboksylan, tlenek propylenu,  $\text{Cl}_2\text{C}=\text{CH}_2$  (ii), 3%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , [55]; 40% (iii);  
b)  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_3\text{COCl}-\text{PCl}_3$  (i), hydroliza  $\text{H}_2\text{O}-\text{HCl}$ , 25% (ii)

Scheme 11. Synthesis of ( $\pm$ )-1-aminobenzocyclobutane-1-phosphonic acid (**9**):

- a) THF,  $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{ONO}$ , [54] (i),  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ , benzenodiazono-2-carboxylate, 1,2-epoxypropane,  $\text{Cl}_2\text{C}=\text{CH}_2$  (ii), 3%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , [55]; 40% (iii);  
b)  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_3\text{COCl}-\text{PCl}_3$  (i), hydrolysis  $\text{H}_2\text{O}-\text{HCl}$ , 25% (ii)



Schemat 12. Synteza kwasów ( $\pm$ )-2-amino-1,2,3,4-tetrahydronaftaleno-2-fosfonowego (**10**)

i ( $\pm$ )-2-amino-1,2,3,4-tetrahydronaftaleno-2-karboksylowego (**11**):

- a)  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_3\text{COCl}-\text{PCl}_3$  (i), hydroliza  $\text{H}_2\text{O}-\text{HCl}$ , 28% (ii) [56];  
b)  $\text{H}_2\text{O}-\text{EtOH}-(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3-\text{NaCN}$ , 88%; c)  $\text{H}_2\text{O}-\text{Ba}(\text{OH})_2$ , 38%

Scheme 12. Synthesis ( $\pm$ )-2-amino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-phosphonic acid (**10**) and ( $\pm$ )-2-amino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2-carboxylic acid (**11**):

- a)  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_3\text{COCl}-\text{PCl}_3$  (i), hydrolysis  $\text{H}_2\text{O}-\text{HCl}$ , 28% (ii) [56];  
b)  $\text{H}_2\text{O}-\text{EtOH}-(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3-\text{NaCN}$ , 88%; c)  $\text{H}_2\text{O}-\text{Ba}(\text{OH})_2$ , 38%

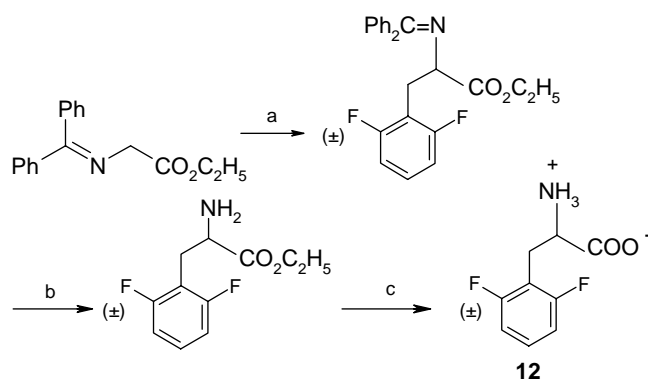
Drugi z zaprojektowanych aminokwasów – racemiczny kwas 2-amino-1,2,3,4-tetrahydronaftaleno-2-fosfonowy (**10**) – otrzymałem z 3,4-dihydro-2(1*H*)-naftalenonu ( $\beta$ -tetralonu) (schemat 12). Dla porównania otrzymałem również racemiczny kwas 2-amino-1,2,3,4-tetrahydronaftaleno-2-karboksyowy (**11**) poprzez 7,8-benzo-1,3-diazaspiro[4.5]

dekan-2,4-dion (hydantoinę  $\beta$ -tetralonu) (schemat 12).

Otrzymane aminokwasy **8–10** są nowymi, nieopisanymi dotąd związkami. Właściwości inhibitorowe aminokwasów **9–11** w stosunku do PAL można uporządkować w następującym szeregu: **9** > **10** > **8** > **11**, ich omówienie jest tematem rozdz. 3.4.1.

### 3.1.3. Inne analogi

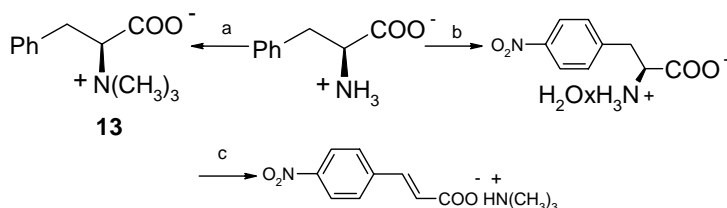
(*S*)-2',6'-difluorofeniloalanina jest produktem reakcji kwasu (*E*)-2',6'-difluorocynamonowego z amoniakiem, katalizowanej przez rekombinowaną amoniakoliazę feniloalaniny [57] (por. rozdz. 3.4.1.4). W kolejnym etapie badań podjąłem się zatem syntezy racemicznej 2,6-difluorofeniloalaniny (**12**). Jako substrat wybrałem *N*-difenylometylideno-glicynian etylu [58], a jako odczynnik elektrofilowy – bromek 2,6-difluorobenzylowy, który otrzymałem z alkoholu 2,6-difluorobenzylowego. *N*-Difenylometylideno-glicynian etylu alkilowałem za pomocą bromku 2,6-difluorobenzylowego w warunkach reakcji dwufazowej ciecz–ciało stałe [59]. Racemiczna 2,6-difluorofeniloalanina (**12**) jest nieopisanym związkiem. Przebieg syntezy przedstawiono na schemacie 13.



Schemat 13. Synteza ( $\pm$ )-2,6-difluorofeniloalaniny (**12**): a) 2,6-F<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Br, CH<sub>3</sub>CN, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 95%; b) Et<sub>2</sub>O–stęż. HCl, 57%; c) hydroliza HCl–H<sub>2</sub>O, 36%  
 Scheme 13. Synthesis of ( $\pm$ )-2,6-difluorophenylalanine (**12**): a) 2,6-F<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Br, CH<sub>3</sub>CN, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 95%; b) Et<sub>2</sub>O–conc. HCl, 57%; c) hydrolysis HCl–H<sub>2</sub>O, 36%

Wysokorozdzielcza chromatografia na chiralnej kolumnie Chirobiotic T (eluent: woda–etanol) umożliwiła całkowite rozdzielenie racemicznej 2,6-difluorofeniloalaniny (**12**) na enancjomery [57].

Interesujące wydawało się otrzymanie *N,N,N*-trimetylo-(*S*)-fenyloalaniny (**13**, schemat 14) i zbadanie oddziaływania tego związku z amoniakolizacją fenyloalaniny. Analog substratu zawierający grupę  $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$  zamiast grupy  $\text{NH}_3^+$  umożliwia sprawdzenie hipotezy Hansona [29], według której grupa aminowa (*S*)-fenyloalaniny reaguje z elektrofilową grupą prostetyczną podczas procesu katalitycznego. Taki sam etap reakcji enzymatycznej, postulowany przez Calabrese i in. [25], został przedstawiony na schemacie 5b. *N,N,N*-Trimetylo-(*S*)-fenyloalaninę (**13**) otrzymałem z (*S*)-fenyloalaniny za pomocą *O*-metylo-*N,N'*-diizopropylizomocznika [60].



Schemat 14. Synteza *N,N,N*-trimetylo-(*S*)-fenyloalaniny (**13**) [60] i (*S*)-4-nitrofenyloalaniny [61] oraz przebieg reakcji *N*-metylowania (*S*)-4-nitrofenyloalaniny: a)  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_3\text{OC}(=\text{N}i\text{C}_3\text{H}_7)\text{NH}i\text{C}_3\text{H}_7$ , 20%; b) stęż.  $\text{H}_2\text{SO}_4-\text{HNO}_3$ , 43%; c)  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_3\text{OC}(=\text{N}i\text{C}_3\text{H}_7)\text{NH}i\text{C}_3\text{H}_7$

Scheme 14. Synthesis of *N,N,N*-trimethyl-(*S*)-phenylalanine (**13**) [60] and (*S*)-4-nitrophenylalanine [61] as well as the product of *N*-methylation reaction of (*S*)-4-nitrophenylalanine: a)  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_3\text{OC}(=\text{N}i\text{C}_3\text{H}_7)\text{NH}i\text{C}_3\text{H}_7$ , 20%; b) conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4-\text{HNO}_3$ , 43%; c)  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_3\text{OC}(=\text{N}i\text{C}_3\text{H}_7)\text{NH}i\text{C}_3\text{H}_7$

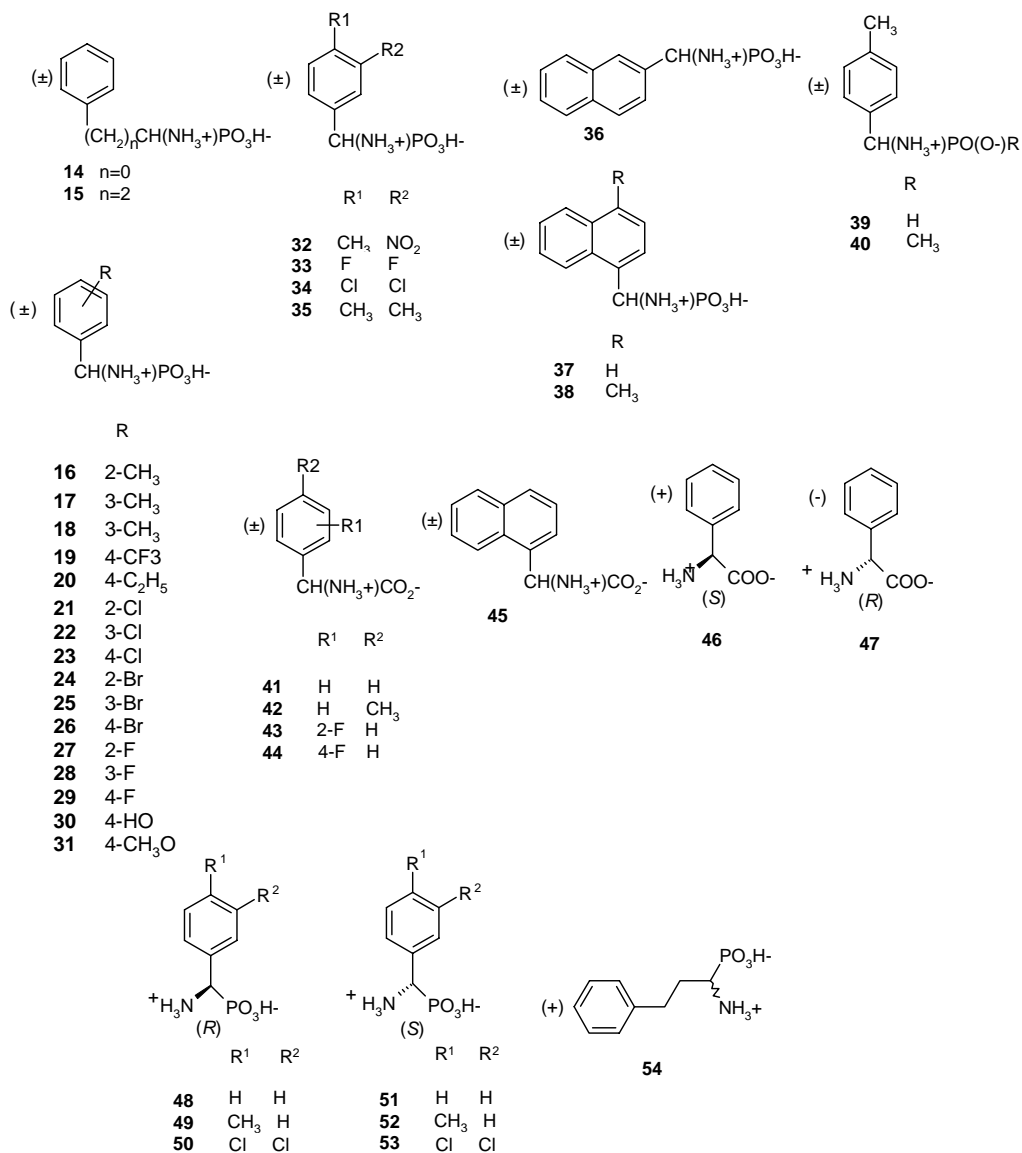
W reakcji nitrowania (*S*)-fenyloalaniny otrzymałem (*S*)-4-nitrofenyloalaninę [61]. Próby otrzymania *N,N,N*-trimetylo-(*S*)-4-nitrofenyloalaniny z (*S*)-4-nitrofenyloalaniny za pomocą *O*-metylo-*N,N'*-diizopropylizomocznika w temperaturze pokojowej prowadzą wyłącznie do produktu eliminacji, tzn. do soli trimetyloamoniowej kwasu (*E*)-4-nitrocynamonowego (schemat 14). Budowę produktu potwierdziłem metodą protonowego rezonansu jądrowego [62]. Różnice w reaktywności między *N,N,N*-trimetylo-(*S*)-4-nitrofenyloalaniną a *N,N,N*-trimetylo-(*S*)-fenyloalaniną odzwierciedlają zaobserwowane różnice w szybkości reakcji katalizowanej amoniakolizacją fenyloalaniny między (*S*)-4-nitrofenyloalaniną a (*S*)-fenyloalaniną [30].

### 3.2. Synteza analogów fenyloglicyny

W momencie rozpoczęcia moich badań była znana aktywność inhibitorowa analogów fenyloalaniny, podstawionych w pierścieniu benzenowym pochodnych kwasu 1-amino-2-fenyloetylofosfonowego [63]. Kontynuując badania nad inhibitorami amoniakolizacji fenyloalaniny, podjąłem się syntezy homologów tego aminokwasu (krótszych o jedną grupę metylenową, czyli pochodnych kwasu 1-aminobenzyl-

fosfonowego), zawierających w pierścieniu podstawniki o różnych efektach elektro-  
nowych i sterycznych [64].

Wzory strukturalne otrzymanych aminokwasów **14–54** przedstawiono na rys. 10. Pochodne kwasu 1-aminobenzylfosfonowego otrzymałem, wykorzystując różne warianty reakcji amidoalkilowania trójwartościowych związków fosforu (reakcją Oleksy-  
szyna) oraz fosfonylowanie podstawionych *N*-benzylidenodifenylometyloamin.

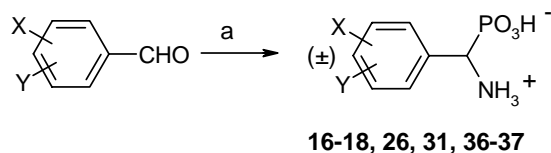


Rys. 10. Wzory strukturalne otrzymanych mono- i dwupodstawionych pochodnych kwasu 1-aminobenzylfosfonowego i podobnych związków (**14–54**) [64]



Fig. 10. Structures of obtained 1-aminobenzylphosphonic acid mono- and disubstituted derivatives and related compounds (**14–54**) [64]

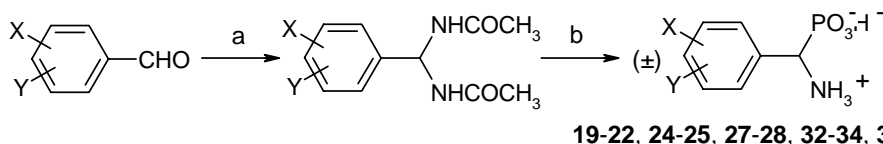
Kwasy aminofosfonowe **16–18**, **26**, **30**, **31**, **36** i **37** otrzymałem bezpośrednio z aldehydów (schemat 15), stosując procedurę A [48, 49].



Schemat 15. Synteza podstawionych pochodnych kwasu (±)-1-aminobenzylfosfonowego z aldehydów (procedura A) [64]: a)  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_3\text{COCl}-\text{PCl}_3$  (i), hydroliza  $\text{HCl}-\text{H}_2\text{O}$ , 10–45% (ii)

Scheme 15. Synthesis of (±)-1-aminobenzylphosphonic acid derivatives from aldehydes (procedure A) [64]: a)  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_3\text{COCl}-\text{PCl}_3$  (i), hydrolysis  $\text{HCl}-\text{H}_2\text{O}$ , 10–45% (ii)

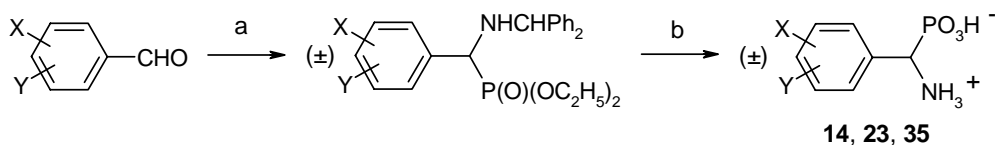
Do syntezy kwasów aminofosfonowych **19–22**, **24**, **25**, **27–29**, **32–34** i **38** otrzymałem według procedury B [48, 65] (schemat 16) jako substraty wykorzystałem podstawione benzylidenobisacetamidy.



Schemat 16. Synteza podstawionych pochodnych kwasu (±)-1-aminobenzylfosfonowego z benzylidenobisamidów (procedura B) [64]: a)  $\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_3\text{COOH}-(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , b)  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{PCl}_3$  (i), hydroliza  $\text{HCl}-\text{H}_2\text{O}$  (ii); wydajność a i b 9–31%

Scheme 16. Synthesis of (±)-1-aminobenzylphosphonic acid derivatives from benzylidenebisamides (procedure A) [64]: a)  $\text{CH}_3\text{CONH}_2-\text{CH}_3\text{COOH}-(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , b)  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{PCl}_3$  (i), hydrolysis  $\text{HCl}-\text{H}_2\text{O}$  (ii); total yields 9–31%

Kwasy aminofosfonowe **14**, **23** i **35** otrzymałem w reakcji poprzez podstawione w pierścieniu benzenowym pochodne 1-(difenylometyloamino)benzylfosfonianu dietylu (schemat 17, procedura C) w procedurze Greena i in. [66].



Schemat 17. Synteza podstawionych pochodnych kwasu (±)-1-aminobenzylfosfonowego metodą hydrofosfonylowania podstawionych *N*-benzylidenodifenylometyloamin (procedura C) [64]:

a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{CHNH}_2-\text{K}_2\text{CO}_3$  (i),  $\text{H}(\text{O})\text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$  (ii);

b) hydroliza  $\text{HCl}-\text{H}_2\text{O}$ ; wydajność dla a) i b) 26–34%

Scheme 17. Synthesis of (±)-1-aminobenzylphosphonic acid derivatives by hydrophosphonylation

of *N*-benzylidenediphenylmethylamine (procedure C) [64]: a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{CHNH}_2-\text{K}_2\text{CO}_3$  (i),  $\text{H}(\text{O})\text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ ; b) hydrolysis  $\text{HCl}-\text{H}_2\text{O}$  (ii); total yields 26–34%

Spośród zastosowanych metod syntezy pochodnych kwasu 1-aminobenzylfosfonowego procedura C okazała się najwygodniejsza. Efekty steryczne i elektroneowe mogą jednak stanowić czynnik ograniczający zastosowanie tej metody [50–53]. Podobnie jak  $(\pm)$ -1-benzhydryloaminoindano-1-fosfonian dietylu (schemat 10),  $(\pm)$ -1-benzhydryloamino-1-(9'-antranylo)metylofosfonian dietylu (otrzymany z 9-formyloantracenu, związek nie przedstawiony na schemacie) w warunkach kwaśnej hydrolizy zamiast oczekiwanego kwasu 1-amino-1-(9'-antranylo)metylofosfonowego daje produkty rozpadu: 9-formyloantracen, sól benzhydryloaminy oraz kwas fosforowy(III) i jego estrowe pochodne [53]. Reakcję rozpadu tych dwóch aminofosfonianów można nazwać reakcją retro Kabachnika–Fieldsa. Jest ona podobna do kilku wcześniej zauważonych reakcji rozpadu pochodnych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych [52, 67]. O przyczynach rozpadu tego rodzaju związków, w których cząsteczkach istnieją przeszkody steryczne, była już mowa z okazji rozpadu  $(\pm)$ -1-benzhydryloaminoindano-1-fosfonian dietylu (s. 21).

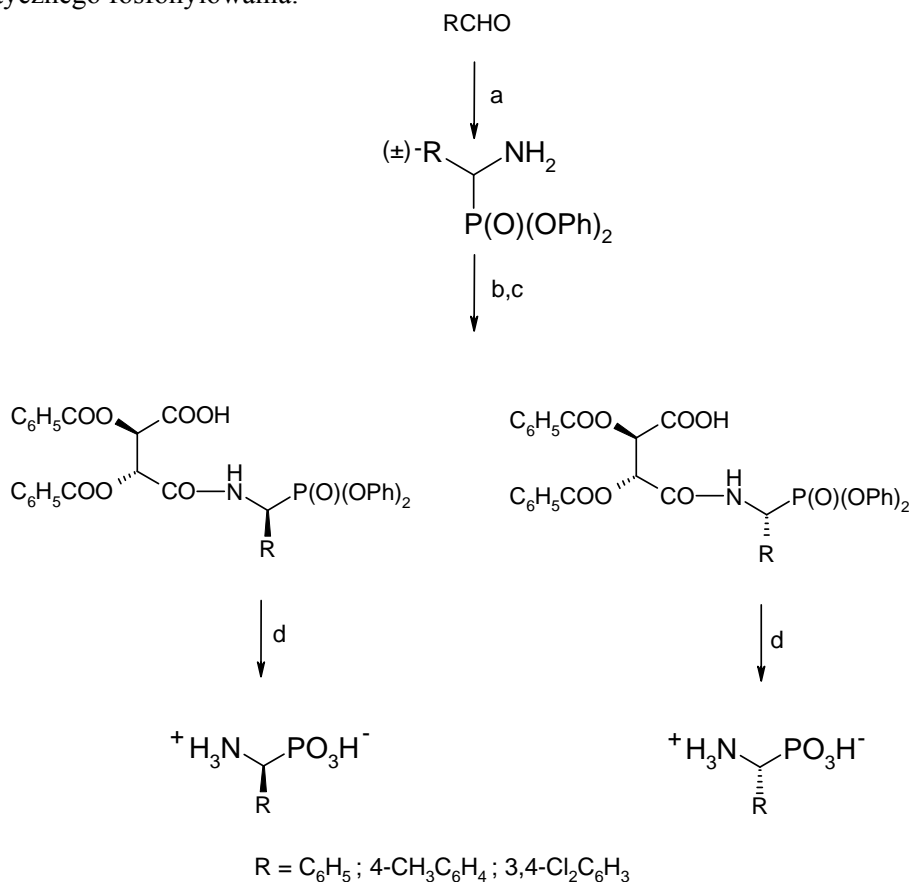
Synteza związków **35** i **38** wymagała wcześniejszego otrzymania aldehydu 4-metylnaftoesowego i 3,4-dimetylobenzaldehydu. Pięć aminokwasów: **41**, **43**, **44**, **46** i **47** (rys. 10) było produktami handlowymi. Kwas 1-amino-3-fenylopropylofosfonowy (**15**) otrzymałem z 1-hydroksyimino-3-fenylopropylofosfonianu diizopropylu [68] metodą opisaną w literaturze [69]. Kwas 1-amino-4'-metylobenzylfosfonawy (**39**) otrzymałem z *p*-toluidenobisacetamidu i kwasu fosforowego(III) [48, 70], a kwas 1-amino-4'-metylobenzyl(metylo)fosfinowy (**40**) z *p*-toluidenobisacetamidu i metylodichlorofosfiny według podobnej procedury [48, 65]. Aminokwasy **42** oraz **45** otrzymałem metodą Streckera [71]; ich aktywność porównałem z aktywnością odpowiadających im kwasów 1-aminoalkilofosfonowych (**18** i **37**).

Niektóre kwasy 1-aminofosfonowe (**48–54**, rys. 10) otrzymałem jako związki wzbogacone enancjomerycznie wskutek rozdziału diastereoizomerycznych amidów (schemat 18). Te ostatnie otrzymałem z  $(\pm)$ -1-aminoalkilofosfonianów difenyłu i bezwodnika kwasu  $(-)$ -*O,O*-dibenzoilo-*l*-winowego według procedury Kafarskiego [72], natomiast wyjściowe  $(\pm)$ -1-aminoalkilofosfoniany difenyłowe metodą Oleksyszyna [73]. Przebieg syntezy i rozdział tych związków przedstawiono na schemacie 18.

Czystość enancjometryczna otrzymanych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych **48–54**, którą oznaczono metodami  $^{31}\text{P}$  NMR [72] (dla amidoestrów) i kapilarnej elektroforezy [74] (dla wolnych aminokwasów) jest nie mniejsza niż 95% [64]. Strukturę i czystość związków (**14–54**) użytych do badań biologicznych potwierdzono metodami spektroskopowymi ( $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  NMR, IR) i za pomocą analizy elementarnej [64].

Omówienie innych metod otrzymywania optycznie czynnych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych, w tym asymetrycznej syntezy, można znaleźć w przeglądzie Kulkhara [75]. W stereoselektywnej syntezie tej grupy związków zdobyłem własne doświadczenia. Badałem reakcję fosfonylowania *N*-alkilideno-(*R*)-1-fenyloetyloaminy oraz *N*-alkilideno-(*S*)-1-fenyloetyloaminy za pomocą fosforynu tris(trimetylosili-

lowego) [76], którego cząsteczka zawiera przeszkody steryczne, w obecności kwasów Lewisa. Jak się wydaje, była to jedna z pierwszych reakcji diastereoselektywnego katalicznego fosfonylowania.



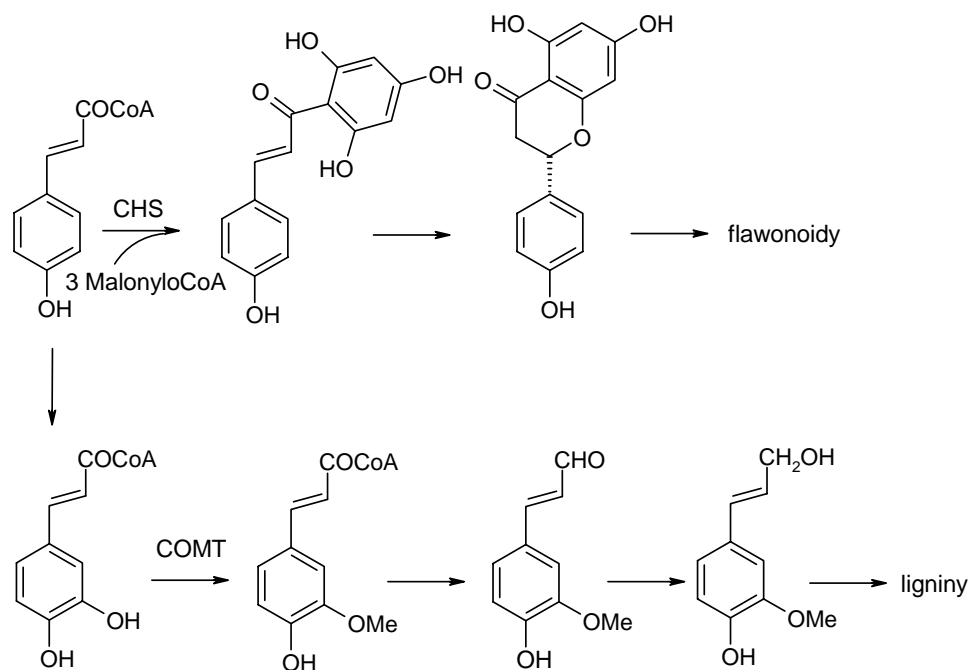
Schemat 18. Sposób otrzymania enancjomerycznie wzbogaconych kwasów aminofosfonowych (**48–54**) [64]: a) CH<sub>3</sub>COOH, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OC(O)NH<sub>2</sub>, P(OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub> (i), HBr-CH<sub>3</sub>COOH (ii), 2M NaOH-CHCl<sub>3</sub>, 21–50% (iii); b) dioksan, bezwodnik kwasu (-)-*O,O*-dibenzoilo-*l*-winowego; c) krystalizacja i rekrystalizacja obu diastereoizomerów (i); d) CH<sub>3</sub>COOH, 40% HBr, wydajność b)–d) 4–12%

Scheme 18. Synthesis of aminophosphonic acids enriched enantiomerically (**48–54**) [64]: a) CH<sub>3</sub>COOH, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OC(O)NH<sub>2</sub>, P(OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub> (i), HBr-CH<sub>3</sub>COOH (ii), 2M NaOH-CHCl<sub>3</sub> (iii), 21–50%; b) dioxane, (-)-*O,O*-dibenzoil-*l*-tartric anhydride; c) crystallization and recrystallization of both diastereoisomers (i); d) CH<sub>3</sub>COOH-40% HBr, yields b)–d) 4–12%

### 3.3. Synteza analogów kwasu (*E*)-cynamonowego

Kwas (*E*)-cynamonowy i jego analogi jako inhibitory amoniakolizy fenyloalaniny pochodzącej z różnych źródeł były badane przez kilku autorów [77–80].

Kwas (*E*)-cynamonowy jest nie tylko produktem reakcji katalizowanej amoniakolizacją fenyloalaniny, ale również substratem ligazy estru koenzymu A i hydroksylaz (w pozycjach 4',3' i 5'). Są to kolejne enzymy szlaku biosyntezy fenylopropanoidów, którego końcowymi produktami są m.in. ligniny, flawonoidy, kumaryny, stilbeny, taniny [1] (schemat 2). Badanie właściwości inhibitorowych związków o budowie zbliżonej do kwasu (*E*)-cynamonowego wydaje się zadaniem szczególnie interesującym pod względem poszukiwania selektywnego inhibitora *O*-metylotransferazy kwasu kawowego (COMT; EC 2.1.1.68) oraz chalconowej syntazy (CHS; EC 2.3.1.74), czyli dwóch dalszych enzymów szlaku biosyntezy fenylopropanoidów.



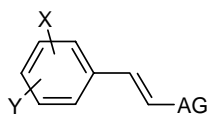
Schemat 19. Fragment szlaku biosyntezy fenylopropanoidów uwzględniający chalconową syntazę (CHS) i *O*-metylotransferazę kwasu kawowego (COMT) [1]

Scheme 19. Fragment of phenylpropanoid biosynthesis route including chalcone synthase (CHS) and caffeic acid *O*-methyltransferase (COMT) [1]

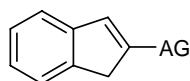
COMT jest enzymem tego fragmentu szlaku biosyntezy fenylopropanoidów, który prowadzi do lignin, a CHS jest odnogą szlaku prowadzącą do flawonoidów (schemat 19). Dla obu enzymów selektywny inhibitor *in vivo* stwarza potencjalną możliwość oddzielnego hamowania biosyntezy flawonoidów i biosyntezy lignin. Dzięki poznanej strukturze krystalicznej COMT [81] i CHS [82, 83] można zbudować trójwymiarowe modele tych enzymów i znacznie ograniczyć liczbę potencjalnych inhibitorów.

Do badań wybrałem dwadzieścia osiem analogów kwasu (*E*)-cynamonowego (56–83), których wzory strukturalne znajdują się na rys. 11 [84]. Wśród nich są związki

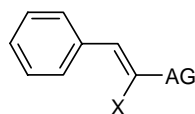
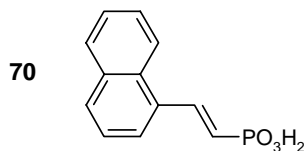
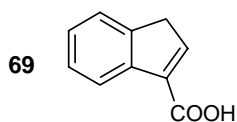
syntetyzowane (59, 60, 62–74, 76, 80–81) oraz produkty handlowe (55–58, 61, 75, 77–79, 82–83). Można je podzielić na następujące klasy związków: kwasy karboksylowe, kwasy fosfonowe i fosfonawe, kwasy boronowe oraz związki z grupą nitrową.



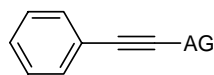
	AG	X, Y
55	COOH	H, H
56	COOH	4-CH <sub>3</sub> O, H
57	COOH	3,4-OCH <sub>2</sub> O
58	COOH	4-CF <sub>3</sub> , H
59	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	H, H
60	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> O, H
61	NO <sub>2</sub>	H, H
62	NO <sub>2</sub>	4-HO, 3-CH <sub>3</sub> O
63	PO <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	H, H
64	PO <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> O, H
65	B(OH) <sub>2</sub>	H, H



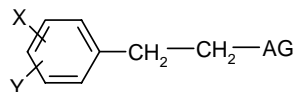
	AG
66	COOH
67	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>
68	PO <sub>2</sub> H <sub>2</sub>



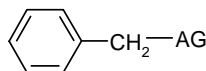
	AG	X
71	COOH	CH <sub>3</sub>
72	NO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
73	COOH	CH <sub>2</sub> Br
74	COOH	NHCOCH <sub>3</sub>



	AG
75	COOH
76	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>



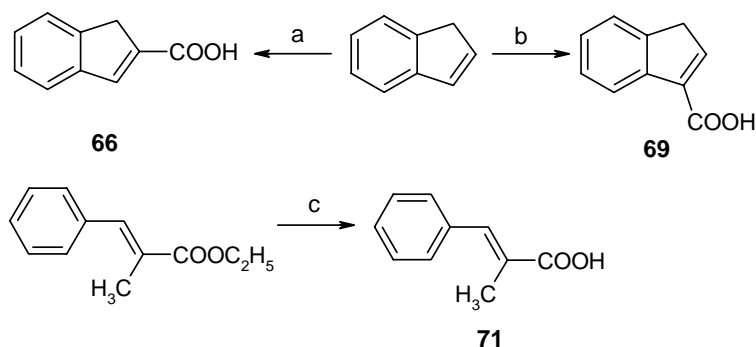
	AG	X, Y
77	COOH	H, H
78	COOH	4-HO, H
79	COOH	3,4-OCH <sub>2</sub> O
80	NO <sub>2</sub>	H, H
81	B(OH) <sub>2</sub>	H, H



	AG
82	COOH
83	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>

Rys. 11. Wzory strukturalne kwasu (*E*)-cynamonowego i jego analogów (**55–83**) [84]  
 Fig. 11. Structure of (*E*)-cinnamic acids and its analogues (**55–83**) [84]

Sposób otrzymywania trzech kwasów karboksylowych: 1*H*-indeno-2-karboksyowego (**66**), 3*H*-indeno-1-karboksyowego (**69**) i (*E*)-2-metylo-3-fenyloakrylowego (**71**) spośród czternastu badanych przedstawiono na schemacie 20. Otrzymywanie kwasu (*E*)-2-bromometylo-3-fenyloakrylowego (**73**) przedstawiono na schemacie 7. Kwas (*E*)-2-acetamido-3-fenyloakrylowy (**74**) otrzymałem w reakcji kondensacji *N*-acetyloglicyny z benzaldehydem [85].



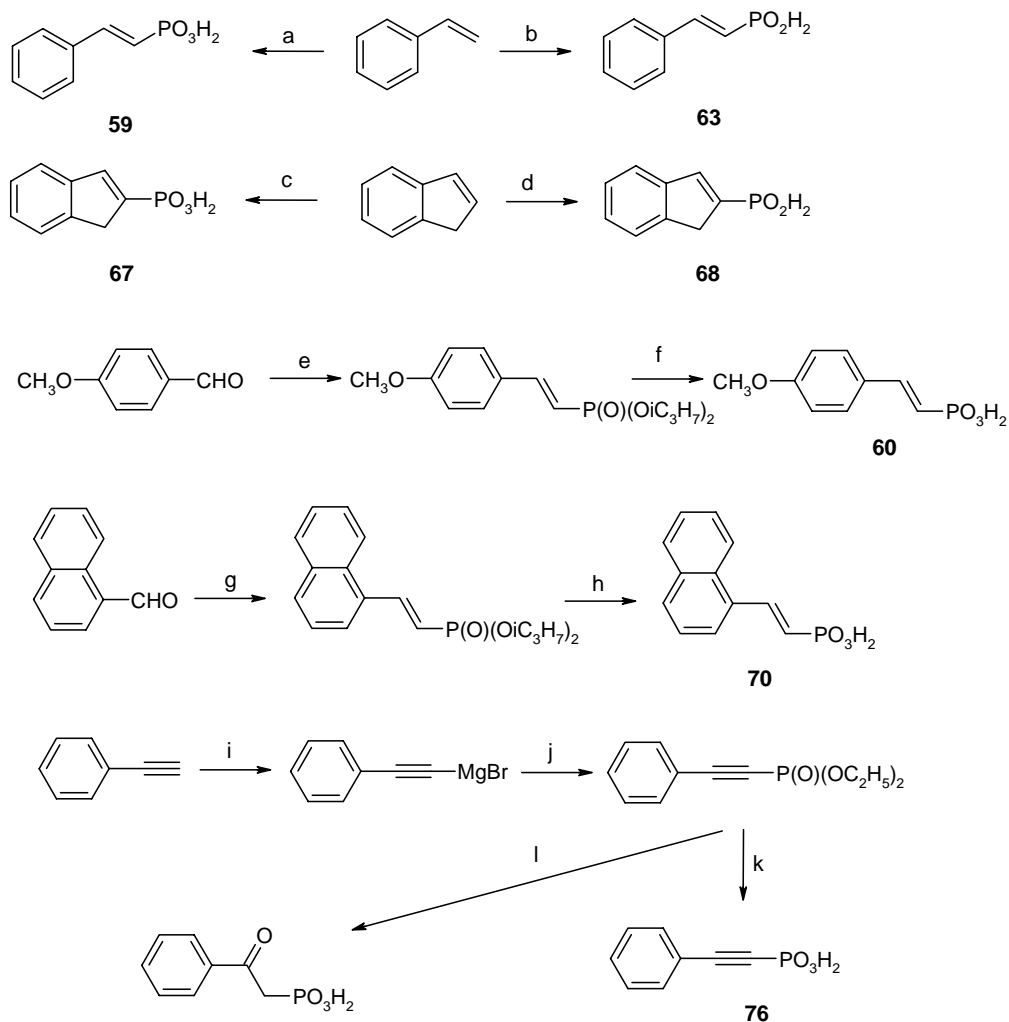
Schemat 20. Synteza kwasów karboksylowych [84]: a) (COCl)<sub>2</sub>, 140 °C (i), hydroliza, NaHCO<sub>3</sub>, HCl do pH ~1, 36% (ii); b) Et<sub>2</sub>O–BuLi (i), CO<sub>2</sub> (st.) (ii), HCl, 25% (iii); c) CH<sub>3</sub>COOH–40% HBr, 32% (i)  
 Scheme 20. Synthesis of carboxylic acids [84]: a) (COCl)<sub>2</sub>, 140 °C (i), hydrolysis, NaHCO<sub>3</sub>, HCl to pH ~1, 36% (ii); b) Et<sub>2</sub>O–BuLi (i), CO<sub>2</sub> (solid) (ii), HCl, 25% (iii); c) CH<sub>3</sub>COOH–40% HBr, 32% (i)

Na schemacie 21 przedstawiono syntezę siedmiu kwasów fosfonowych i fosfonawych: 2-fenyloetynylofosfonowego (**59**), 2-fenyloetynylofosfonawego (**63**), 1*H*-indeno-2-fosfonowego (**67**), 1*H*-indeno-2-fosfonawego (**68**), 2-(4'-metoksyfenylo)etynylofosfonowego (**60**), 2-(1'-naftylo)etynylofosfonowego (**70**) i 2-fenyloetynylofosfonowego (**76**).

2-Fenyloetynylofosfonian dietylu hydrolizowany kwasem solnym daje kwas 2-fenylo-2-oksoetylofosfonowy, który jest produktem przyłączenia cząsteczki wody do związku **76** (schemat 21) [84, 86], nie zaś, jak opisano w literaturze [87], kwasem 2-fenyloetynylofosfonowym (**76**). 2-Fenyloetynylofosfonian dietylu w reakcji z bromkiem trimetylosililowym, a następnie hydrolizowany w temperaturze pokojowej, daje kwas 2-fenyloetynylofosfonowy (**76**) (schemat 21) [84, 86]. Otrzymany związek **76** [84] różni się temperaturą topnienia od podanej w publikacji [87]. Kwas 2-fenyloetynylofosfonowy (**76**) scharakteryzowałem metodami spektroskopowymi (tabela 6).

Synteza kwasów fosfonawych według procedury Fridlanda i Efremova [88] przebiega w trzech etapach: (a) addycja pentachlorku fosforu do alkenów w roztworze benzenowym, (b) redukcja otrzymanego adduktu za pomocą fosfiny, zakończona destylacją pod zmniejszonym ciśnieniem i (c) hydroliza  $\alpha,\beta$ -nienasyconej (P,P-di-

chloro)fosfiny do nienasyconego kwasu fosfonawego. Stwierdziłem iż zalecany przez autorów [88] etap eliminacji chlorowodoru z  $\beta$ -chloro(P,P-dichloro)fosfiny za pomocą trietyloaminy można pominąć, ponieważ po destylacji wyizolowałem  $\alpha,\beta$ -nienasyconą (P,P-dichloro)fosfinę [84], nie zaś  $\beta$ -chloro(P,P-dichloro)fosfinę [88].

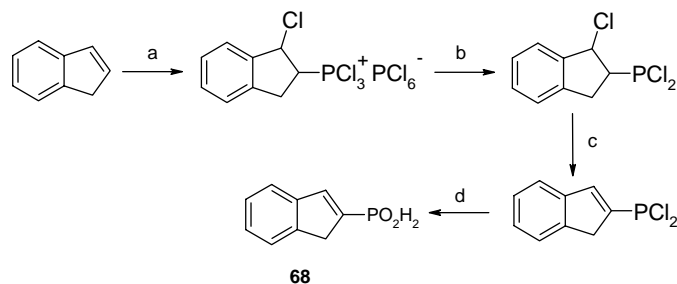


Schemat 21. Synteza kwasów fosfonowych i fosfonawych [84]: a)  $\text{C}_6\text{H}_6\text{-PCl}_5$  (i), hydroliza, 37% (ii); b)  $\text{C}_6\text{H}_6\text{-PCl}_5$  (i),  $\text{PH}_3$  (ii), hydroliza, 25% (iii); c)  $\text{C}_6\text{H}_6\text{-PCl}_5$  (i), hydroliza (ii), estyfikacja  $\text{HC}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ , destylacja pzc (iii),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-(CH}_3)_3\text{SiBr}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ , 6% (iv); d)  $\text{C}_6\text{H}_6\text{-PCl}_5$  (i),  $\text{PH}_3$ , destylacja pzc dichloro-fosfiny (ii), hydroliza, 24% (iii); e)  $\text{Et}_2\text{O-NaH-CH}_2[\text{P}(\text{O})(\text{OiC}_3\text{H}_7)_2]_2$  (i),  $\text{H}_2\text{O}$ , kolumna chromatograficzna, 42% (ii); f)  $\text{CCl}_4\text{-(CH}_3)_3\text{SiI}$  (i),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ , 39% (ii); g)  $\text{Et}_2\text{O-NaH-CH}_2[\text{P}(\text{O})(\text{OiC}_3\text{H}_7)_2]_2$  (i),  $\text{H}_2\text{O}$ , destylacji pzc, 69% (ii); h)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-(CH}_3)_3\text{SiBr}$  (i),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ , 89% (ii); i)  $\text{Et}_2\text{O-C}_2\text{H}_5\text{MgBr}$  (i),  $\text{ClP}(\text{O})(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$  (ii),  $\text{H}_2\text{O}$ , destylacji pzc, 36% (iii); k)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-(CH}_3)_3\text{SiBr}$  (i),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ , 78% (ii); l)  $\text{HCl-H}_2\text{O}$ , 47% (ii).  
 Scheme 21. Synthesis of phosphonic and phosphonous acids [84]: a)  $\text{C}_6\text{H}_6\text{-PCl}_5$  (i), hydrolysis, 37% (ii); b)  $\text{C}_6\text{H}_6\text{-PCl}_5$  (i),  $\text{PH}_3$  (ii), hydrolysis, 25% (iii); c)  $\text{C}_6\text{H}_6\text{-PCl}_5$  (i), hydrolysis (ii), esterification by b)  $\text{C}_6\text{H}_6\text{-PCl}_5$  (i),  $\text{PH}_3$  (ii), hydrolysis, 25% (iii); c)  $\text{C}_6\text{H}_6\text{-PCl}_5$  (i), hydrolysis (ii), esterification by

$\text{HC}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ , distillation under reduced pressure (iii),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{H}_2\text{O}$ , 6% (iv); d)  $\text{C}_6\text{H}_6-\text{PCl}_5$  (i),

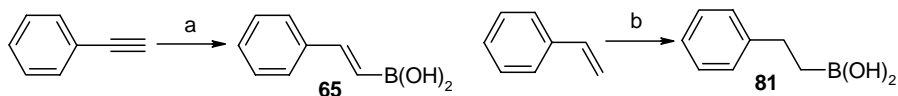
$\text{PH}_3$ , distillation of dichlorophosphine under reduced pressure (ii), hydrolysis, 24% (iii); e)  $\text{Et}_2\text{O}-\text{NaH}-\text{CH}_2[\text{P}(\text{O})(\text{O}i\text{C}_3\text{H}_7)_2]_2$  (i),  $\text{H}_2\text{O}$ , column chromatography, 42% (ii); f)  $\text{CCl}_4-(\text{CH}_3)_3\text{SiI}$  (i),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{H}_2\text{O}$ , 39% (ii); g)  $\text{Et}_2\text{O}-\text{NaH}-\text{CH}_2[\text{P}(\text{O})(\text{O}i\text{C}_3\text{H}_7)_2]_2$  (i),  $\text{H}_2\text{O}$ , distillation under reduced pressure, 69% (ii); h)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$  (i),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{H}_2\text{O}$ , 89% (ii); i)  $\text{Et}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5\text{MgBr}$  (i),  $\text{ClP}(\text{O})(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$  (ii),  $\text{H}_2\text{O}$ , distillation under reduced pressure, 36% (iii); k)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$  (i),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{H}_2\text{O}$ , 78% (ii); l)  $\text{HCl}-\text{H}_2\text{O}$ , 47%

Przebieg omówionych reakcji przedstawiono na przykładzie syntezy kwasu *1H*-indeno-2-fosfonawego (**68**) (schemat 22). Syntezę kwasów boronowych przedstawiono na schemacie 23, na schemacie 24 zaś metodę syntezy związków nitrowych. W tabeli 6 (rozdz. 4.2) zestawiono właściwości fizykochemiczne otrzymanych analogów kwasu (*E*)-cynamonowego.



Schemat 22. Produkty pośrednie w syntezie kwasu *1H*-indeno-2-fosfonawego (**68**) z indenu: a)  $\text{C}_6\text{H}_6-\text{PCl}_5$ ; b)  $\text{PH}_3$ ; c) destylacja pzc; d)  $\text{H}_2\text{O}$ ; a)–d) 24%

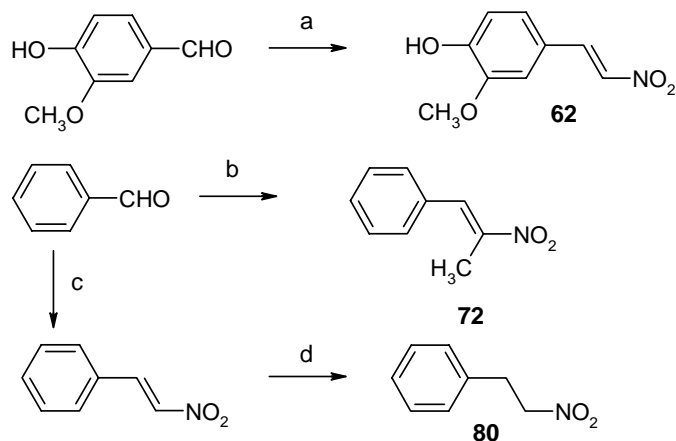
Scheme 22. Intermediate products in the synthesis of *1H*-indene-2-phosphonous acid (**68**) from indene: a)  $\text{C}_6\text{H}_6-\text{PCl}_5$ ; b)  $\text{PH}_3$ ; c) distillation under reduced pressure; d)  $\text{H}_2\text{O}$ ; a)–d) 24%



Schemat 23. Synteza kwasów boronowych [84]: a)  $o\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}_2\text{BH}$  (i),  $\text{H}_2\text{O}$ , 39% (ii); b)  $o\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}_2\text{BH}$ , (ii)  $\text{H}_2\text{O}$ , 36%

Scheme 23. Synthesis of boronic acids [84]: a)  $o\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}_2\text{BH}$  (i),  $\text{H}_2\text{O}$ , 39% (ii); b)  $o\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}_2\text{BH}$ , (ii)  $\text{H}_2\text{O}$ , 36%





Schemat 24. Synteza związków nitrowych [84]: a)  $\text{CH}_3\text{COOH}\text{-NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})\text{-CH}_3\text{NO}_2$ , 62%; b)  $\text{CH}_3\text{COOH}\text{-NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})\text{-CH}_3\text{NO}_2$ , 50%; c)  $\text{CH}_3\text{COOH}\text{-NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})\text{-CH}_3\text{NO}_2$ , 55%; d) dioksan-*etanol*- $\text{NaBH}_4$  (i),  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , kolumna chromatograficzna, 20% (ii)  
 Scheme 24. Synthesis of nitro compounds [84]: a)  $\text{CH}_3\text{COOH}\text{-NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})\text{-CH}_3\text{NO}_2$ , 62%; b)  $\text{CH}_3\text{COOH}\text{-NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})\text{-CH}_3\text{NO}_2$ , 50%; c)  $\text{CH}_3\text{COOH}\text{-NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})\text{-CH}_3\text{NO}_2$ , 55%; d) dioxane-*ethanol*- $\text{NaBH}_4$  (i),  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , column chromatography, 20% (ii)

### 3.4. Właściwości otrzymanych związków

#### 3.4.1. Właściwości biologiczne

Właściwości inhibitorowe otrzymanych aminokwasów **2–11** i **14–54** o czystości analitycznej zostały zbadane w laboratorium prof. Amrheina. Wyniki przedstawiono w tabeli 1. Do badania stałej hamowania ( $K_i$ ) użyto surowej amoniakolizazy fenyloalaniny z gryki, do badania stężenia inhibitora, dla którego następuje 50% zmniejszenie zawartości antocyjanin ( $IC_{50}$ ), użyto siewek gryki [45, 64].

Tabela 1. Właściwości inhibitorowe otrzymanych analogów fenyloalaniny i fenyloglicyny [44, 45, 56, 64] w porównaniu ze znanymi inhibitorami (AOPPA i APEPA) [40, 42]  
 Table 1. Properties of analogues of phenylalanine and phenylglycine as inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase and anthocyanin biosynthesis [44, 45, 56, 64].  
 Known inhibitors (AOPPA i APEPA) [40, 42] were used as standards

Numer związku	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a</sup>	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>b</sup>	Numer związku	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>a</sup>	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>b</sup>
<b>1</b> (AOPPA) <sup>c</sup>	0,0014	10	<b>29</b>	1,8	25
( <i>R</i> )-APEPA <sup>d</sup>	1,5	50	<b>30</b>	e	f
<b>2</b>	16,5	f	<b>31</b>	40	>1000
<b>3</b>	1,3	f	<b>32</b>	4,0	82
<b>4</b>	0,08	1,5	<b>33</b>	1,0	16
<b>5</b>	6,3	3000	<b>34</b>	0,21	5

6	e	>1000	35	0,89	24
7	e	f	36	3,7	220
8	e	f	37	0,30	140
9	0,32	140	38	7,5	f
10	e	1800	39	e	f
11	423	f	40	25	550
14	6,5	250	41	9,0	<5000
15	5,0	110	42	0,24	640
16	8,5	4860	43	e	f
17	1,5	23	44	1,3	1500
18	0,25	30	45	1,0	3000
19	8,3	240	46	2,3	3300
20	34	>1000	47	300	>5000
21	e	<1000	48	3,4	53
22	2,0	10	49	0,17	15
23	0,21	10	50	0,08	2,2
24	5,3	1710	51	e	f
25	1,0	15	52	e	f
26	0,29	22	53	3,1	965
27	e	f	54	10	60
28	3,3	67			

<sup>a</sup>Błąd wartości  $K_i$  5–8%; stała Michaelisa ( $K_m$ ) enzymu wynosi 45  $\mu\text{M}$ . <sup>b</sup>Błąd wartości  $I_{50}$  10–15%. <sup>c</sup>Jako odnośnik – kwas ( $\pm$ )-2-aminoksy-3-fenylpropionowy, dane literaturowe [40]. <sup>d</sup>Jako odnośnik kwas ( $R$ )-1-amino-2-fenyletylofosfonowy, dane literaturowe [42]. <sup>e</sup>Obserwowano mniej niż 50% hamowania PAL dla stężenia inhibitora 1 mM. <sup>f</sup>Obserwowano mniej niż 40% hamowania biosyntezy antocyjanin w siewkach gryki dla stężenia inhibitora 1 mM.

#### 3.4.1.1. Właściwości inhibitorowe analogów fenyloalaniny

Kwas ( $\pm$ )-2-aminometylo-3-fenylpropionowy (**2**) [44] okazał się ok. 10 000 razy gorszym inhibitorem amoniakolizacji fenyloalaniny niż kwas ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylpropionowy (**1**) (tabela 1) mimo dużego podobieństwa strukturalnego obu związków. Wykazywał on natomiast właściwości inhibitorowe w stosunku do transaminazy fenyloalaniny z fasoli złotej (*Phaseolus aureus*) [44].

Można założyć, że grupy aminowe w związkach **1** i **2** różnią się zasadowością w podobnym stopniu jak metoksyaminy ( $\text{p}K_{\text{BH}^+} = 12,5$ ) i metyloaminy ( $\text{p}K_{\text{BH}^+} = 10,6$ ). Gdyby o sile wiązania tych związków z enzymem decydowała zasadowość grupy aminowej, aminokwas **2** powinien być silniejszym inhibitorem niż **1**; wyznaczone stałe inhibicji przeczą tej interpretacji (tabela 1). Wydaje się, że obecność atomu tlenu w związku **1** może być przyczyną różnicy między jego aktywnością inhibitorową a aktywnością związku **2** ze względu na możliwość dodatkowego oddziaływania (poprzez wiązanie wodorowe) między inhibitorem (akceptor wiązania wodorowego) a enzymem (donor wiązania wodorowego). Z termodynamicznego punktu widzenia zwiększeniu energii swobodnej oddziaływania inhibitor–enzym o 1,2 kcal/mol w temperaturze 20 °C odpowiada około stukrotnemu zmniejszeniu stałej inhibicji; wzrost energii swobodnej o 3 kcal/mol odpowiada wzrostowi stałej inhibicji o około 5 rzędów wielkości ( $\Delta\lg K = \delta\Delta G/2,3RT$ ,  $R = 1,986 \text{ cal}/(\text{mol}\cdot\text{K})$ ). Za hipotezą

uwzględniając dodatkowo oddziaływanie między inhibitorem **1** a amoniakoliazą fenyloalaniny przemawia to, że hydrazynowy analog fenyloalaniny, kwas ( $\pm$ )-2-hydrazyno-3-fenylpropionowy, jest również silnym inhibitorem PAL [89]. Jeżeli otrzymany model centrum aktywnego amoniakoliazы fenyloalaniny [23] jest poprawny, to obserwowane różnice stałych inhibicji dla obu związków można uzasadnić oddziaływaniem inhibitora **1** z resztą tyrozyny (110 lub 453). Wydaje się, że hipotezę tę potwierdzają najnowsze dane literaturowe [22], z których wynika, że zwłaszcza tyrozyna 110 może tworzyć postulowane wiązanie wodorowe.

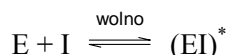
Zarówno kwas (*E*)-2-aminometylo-3-fenylakrylowy (**3**), jak i kwas ( $\pm$ )-2-aminometylo-3-fenylpropionowy (**2**) są bardzo słabymi inhibitorami syntezy antocyjanin ( $IC_{50} \geq 2$  mM [44]) w porównaniu z kwasem ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylpropionowym (**1**) ( $IC_{50} = 10$   $\mu$ M [40]). Mniej labilny konformacyjnie kwas (*E*)-2-aminometylo-3-fenylakrylowy (**3**) [44] jest ok. 1000 razy gorszym inhibitorem amoniakoliazы fenyloalaniny niż kwas ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylpropionowy (**1**) (tabela 1). Interesujący jest też fakt, że kwas (*E*)-2-aminometylo-3-fenylakrylowy (**3**) jest ok. 10 razy silniejszym inhibitorem PAL niż kwas ( $\pm$ )-2-aminometylo-3-fenylpropionowy (**2**).

Ze względu na inhibitorowe właściwości związków **2** i **3**, a zwłaszcza słabą inhibicję syntezy antocyjanin oraz brak specyficzności w hamowaniu amoniakoliazы fenyloalaniny (hamowanie transaminazy fenyloalaniny) zaniechano dalszych poszukiwań inhibitorów PAL wśród związków o budowie podobnej do związków **2** i **3**.

Na podstawie porównania właściwości inhibitorowych kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (**4**) i związków o zbliżonej strukturze (**5–7**) [45] można stwierdzić, że do zachowania silnych właściwości inhibitorowych potrzebna jest obecność trzech grup: aminowej, fosfonowej i pierścienia benzenowego. Grupy te można więc uznać za farmakoforowe. Zamiana grupy fosfonowej na karboksylową powoduje zmniejszenie aktywności inhibitorowej o 3 rzędy wielkości. Jest to zapewne związane z różnicą w oddziaływaniu grupy fosfonowej i karboksylowej z amoniakoliazą fenyloalaniny. Dla analogów fenyloalaniny zamiana grupy fosfonowej ( $PO_3H_2$ ) na fosfonawą ( $PO_2H_2$ ) powoduje zmniejszenie wartości stałej inhibitorowej o rząd wielkości [42]. Warto podkreślić, że kwasy 2-aminoindano-2-fosfonowy (AIP, **4**) i (*R*)-1-amino-2-fenyletylofosfonowy ((*R*)-APEPA) mają trzy takie same grupy farmakoforowe, które są położone względem siebie w różny sposób, co powoduje różnice w oddziaływaniach inhibitor–enzym oraz istotne różnice stałych inhibitorowych. AIP (**4**) jest silniejszym inhibitorem amoniakoliazы fenyloalaniny z gryki (19 razy) i syntezy antocyjanin w siewkach gryki (33 razy) niż (*R*)-APEPA [40, 45]. Zawartość wolnej (*S*)-fenylalaniny w tkance gryki po wcześniejszej 24-godzinnej inkubacji siewek w 10  $\mu$ M roztworze wodnym inhibitora **4** jest około 20 razy większa niż w ślepej próbie. Świadczy to o hamowaniu *in vivo* amoniakoliazы fenyloalaniny i koreluje z hamowaniem biosyntezy antocyjanin [45]. W cząsteczce kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego odległości między grupami farmakoforowymi są ściśle określone i wynikają z geometrii szkieletu cyklopentanu w obu konformerach (schemat 26) – z grupą fosfonową w pozycji pseudoekwatorialnej (**EC**) oraz pseudoaksjalnej (**AC**).

W cząsteczce kwasu (*R*)-1-amino-2-fenyletylofosfonowego występuje natomiast swobodna rotacja wokół dwóch sąsiednich wiązań węgiel–węgiel.

Dodatkowe badania rekombinowanej amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki potwierdziły wcześniejsze obserwacje z użyciem surowego enzymu z gryki [45], że kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (**4**) jest konkurencyjnym inhibitorem enzymu [90]. Z drugiej strony z badań kinetyki hamowania enzymu wynika, że kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (**4**) jest wolnowiążącym się inhibitorem odwracalnym [90]. Reakcję równowagi między enzymem ( $E = \text{PAL}$ ) a inhibitorem ( $I = \text{AIP}$ ) możemy opisać następującym równaniem:



Gwiazdka w tym równaniu oznacza, że końcowy kompleks enzym–inhibitor, o maksymalnej sile wiązania, powstaje w jednym powolnym etapie. Wyznaczone stałe inhibicji i stałe szybkości inhibicji badanych związków podano w tabeli 2. Powolne hamowanie enzymu inhibitorem może oznaczać powolną zmianę w cząsteczce enzymu lub inhibitora. Zmiana stałej hamowania dla cząsteczki enzymu może np. oznaczać zmianę konformacji, wprowadzenie wody do centrum aktywnego lub zmianę stanu oligomerycznego. Zmiana stałej inhibicji dla cząsteczki inhibitora może wiązać się z hydratacją lub dehydratacją grupy funkcyjnej, zmianą stanu jonizacji lub zmianą konformacji [91]. Próba ustalenia, jaka zmiana następuje w omawianym przypadku, jest przedmiotem rozdz. 3.4.3.

Tabela 2. Stałe hamowania ( $K_i$ ) amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki i stałe szybkości asocjacji ( $k_+$ ) i dysocjacji ( $k_-$ ) inhibitor–PAL [90]  
Table 2. Kinetic and inhibition constants of inhibitors

Związek	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_+ \times 10^4$ [ $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]	$k_- \times 10^4$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
<b>4</b> <sup>a</sup>	0,025±0,004		
<b>4</b> <sup>b</sup>	0,007±0,002	2,6±0,04	1,8±0,4
<b>1</b>	0,00038±0,00005	42,6±0,2	1,6±0,2
<b>2</b>	8,9±0,4		
<b>5</b>	1,9±0,1		
<b>(R)-4'-FAPEPA</b> <sup>c</sup>	1,0±0,1		

<sup>a</sup>Zmierzone dla stanu ustalonego. Stała Michaelisa ( $K_m$ ) dla (*S*)-fenyloalaniny wynosi 17,2  $\mu\text{M}$ .

<sup>b</sup>Zmierzone na podstawie szybkości przybywania  $(EI)^*$  w czasie. <sup>c</sup>Jako odnośnik kwas (*R*)-1-amino-2-(4-fluorofenyletylo)fosfonowy ma zbliżoną aktywność inhibitorową do kwasu (*R*)-1-amino-2-fenyletylofosfonowego w teście na surowym PAL z gryki.

Spośród wszystkich znanych inhibitorów amoniakolizy fenyloalaniny kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (**4**) był przedmiotem licznych badań biologicznych jako potencjalny specyficzny inhibitor *in vivo* [45]. Przykłady zastosowania kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (AIP) do badania biosyntezy związków fenylopropanoidowych są cytowane w moich pracach [64, 92].

Istniał pogląd, że silny inhibitor PAL może okazać się herbicydem [39]. Nie stwierdzono tego w przypadku kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego. Zahamowanie biosyntezy metabolitów szlaku fenylopropanoidowego w wyniku zahamowanie amoniakolizy fenyloalaniny za pomocą AIP całkowicie wstrzymuje rozwój rośliny. Zatrzymanie rozwoju jest jednak całkowicie odwracalne i zaprzestanie traktowania rośliny tym inhibitorem powoduje dalszy jej wzrost. Działanie inhibitora nie powoduje żadnych ubocznych zmian w roślinach, takich jak np. zmiana turgoru.

Ze względu na wyjątkowo silne właściwości inhibitorowe kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego wydawało się ciekawe zbadanie wpływu modyfikacji struktury jego cząsteczki na aktywność biologiczną. W tym celu postanowiłem zsyntetyzować kilka związków podobnych do AIP, różniących się wielkością pierścienia i położeniem grup aminowej i fosfonowej.

Racemiczny kwas 1-aminoindano-1-fosfonowy (**8**) wykazywał bardzo małą aktywność inhibitorową (tabela 1). Stała inhibicji PAL dla związku **8** jest ponad 200 razy większa niż stała inhibicji PAL dla kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (**4**). Ponieważ związek **8** jest racematem, więc stała inhibicji PAL jego czystego enancjomeru *R* będzie mniejsza [42]. Mimo to można stwierdzić, że 1-AIP (**8**) jest słabym inhibitorem PAL.

Kwas ( $\pm$ )-1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowy (**9**), zawierający pierścień czteroczłonowy zamiast pięcioczłonowego, okazał się czterokrotnie słabszym inhibitorem PAL niż kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (**4**) (tabela 1). Można również założyć, że czysty enancjomer *R* kwasu 1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowego będzie miał mniejszą stałą inhibicji niż racemiczny związek **9** [42]. Kwas ( $\pm$ )-1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowy (**9**) jest także 100 razy gorszym inhibitorem biosyntezy antocyjanin niż AIP (**4**) (tabela 1). Jeszcze słabszym inhibitorem PAL (50 razy gorszym niż kwas ( $\pm$ )-1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowy) okazał się kwas ( $\pm$ )-2-amino-1,2,3,4-tetrahydronaftaleno-2-fosfonowy (**10**) z pierścieniem sześcioczłonowym w cząsteczce (tabela 1).

Wyniki omówionych badań wskazują na optymalną pod względem aktywności inhibitorowej wielkość pierścienia cyklopentanowego. Zarówno zwiększenie (pierścień cykloheksanowy), jak i zmniejszenie (pierścień cyklobutanowy) pierścienia te właściwości pogarsza. Istotne pozostaje położenie grupy aminowej i fosfonowej w pierścieniu indanu.

Podobieństwo struktury trzeciorzędowej amoniakolizy fenyloalaniny i histydyny znajduje odzwierciedlenie w podobnej budowie inhibitorów obu enzymów [93].

#### 3.4.1.2. Właściwości inhibitorowe analogów fenyloglicyny

Inną grupą otrzymanych i badanych przeze mnie związków były analogi fenyloglicyny **14–54** [64]. Ich właściwości inhibitorowe zestawiono w tabeli 1. Kwas 1-aminobenzylfosfonowy (**14**) i kwas 1-amino-3-fenylpropylfosfonowy (**15**) mogą być rozważane jako homologi kwasu 1-amino-2-fenyletylofosfonowego, znanego inhibitora

PAL [41-42]. Mimo że nieznacznie silniejszym inhibitorem jest związek **15**, do dalszych badań wybrałem podstawione pochodne kwasu 1-aminobenzylfosfonowego (**14**) ze względu na ich mniejszą swobodę konformacyjną w porównaniu ze związkiem **15** (dodatkowa rotacja wokół wiązań węgiel–węgiel). Otrzymałem serię pochodnych kwasu 1-aminobenzylfosfonowego (**16–31**) mono- i dwupodstawionych w pierścieniu benzenowym. Wśród podstawników znalazły się następujące grupy: chloro-, bromo-, fluoro-, metylo-, trifluorometylo-, etylo-, hydroksy- i metoksy- w różnych położeniach (*orto*-, *meta*- i *para*-) (rys. 10). Doświadczenie na siewkach gryki wykazało, że w roztworze zawierającym 100  $\mu\text{M}$  kwasu ( $\pm$ )-1-amino-4'-chlorobenzylfosfonowego (**23**) ( $K_i = 0.23 \mu\text{M}$  i  $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ , tabela 1) następuje 21-krotny wzrost stężenia (*S*)-fenyloalaniny [64]. Oznacza to, że kwas ( $\pm$ )-1-amino-4'-chlorobenzylfosfonowy (**23**) jest *in vivo* inhibitorem PAL. Związki **22** i **17** z podstawnikiem chloro- i metylo- w pozycji *meta*- wykazywały interesujące wartości stałej inhibicji PAL. Z dwóch kolejnych pochodnych – kwasu ( $\pm$ )-1-amino-3',4'-dichlorobenzylfosfonowego (**34**) i kwasu ( $\pm$ )-1-amino-3',4'-dimetylobenzylfosfonowego (**35**), silniejsze hamowanie PAL i syntezy antocyjanin wykazywał związek **34**. Dwa nowe związki o nieznannej konfiguracji absolutnej – kwas (+)-1-amino-3',4'-dichlorobenzylfosfonowy (**50**) i kwas (–)-1-amino-3',4'-dichlorobenzylfosfonowy (**53**) porównano ze związkami o znanej konfiguracji absolutnej: kwasem (*R*)-(+)-1-aminobenzylfosfonowym (**48**) i kwasem (*S*)-(–)-1-aminobenzylfosfonowym (**51**) [94]. Silniejszymi inhibitorami w tej podgrupie związków okazały się związki **50** i **48**. Na podstawie tych wyników z uwzględnieniem stereoselektywności PAL [42] można przypuszczać, że związek **50** ma konfigurację absolutną *R* i – konsekwentnie – związek **53** konfigurację *S*. W celu potwierdzenia tej hipotezy planowane są badania rentgenograficzne związku **50**. Warto zauważyć, że wprowadzenie do pierścienia benzenowego kwasu 1-amino-2-fenyletylofosfonowego dowolnego podstawnika prowadzi do znacznego zmniejszenia aktywności inhibitorowej [95]. Wyjątkiem są *para*-, *meta*- i *orto*-fluorowe pochodne ze względu na zbliżoną wielkość promieni van der Waalsa atomu fluoru i atomu wodoru. Ta obserwacja oraz wyniki badania aktywności inhibitorowej całej serii podstawionych w pierścieniu benzenowym pochodnych kwasu 1-aminobenzylfosfonowego [64] pozwalają przypuszczać, że wielkość hydrofobowej kieszeni substratu w cząsteczce PAL jest ograniczona.

Okazało się także, że pochodne kwasu 1-aminobenzylfosfonowego mogą być silniejszymi inhibitorami niż kwas 1-aminobenzylfosfonowy. Podstawienie dwiema grupami metylowymi lub dwoma atomami chloru w pierścieniu benzenowym w pozycji 3- i 4- spowodowało zwiększenie zdolności inhibitorowych odpowiednich związków. Wydaje się, że skrócenie łańcucha łączącego pierścień benzenowy z grupą fosfonową (o grupę metylenową) w porównaniu z kwasem 1-amino-2-fenyletylofosfonowym umożliwia dobudowanie na zewnątrz pierścienia benzenowego, grupy o porównywalnej wielkości do fragmentu łańcucha usuniętego z zachowaniem w przybliżeniu całkowitej długości cząsteczki.

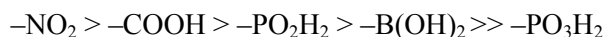
### 3.4.1.3. Właściwości inhibitorowe analogów kwasu (*E*)-cynamonowego

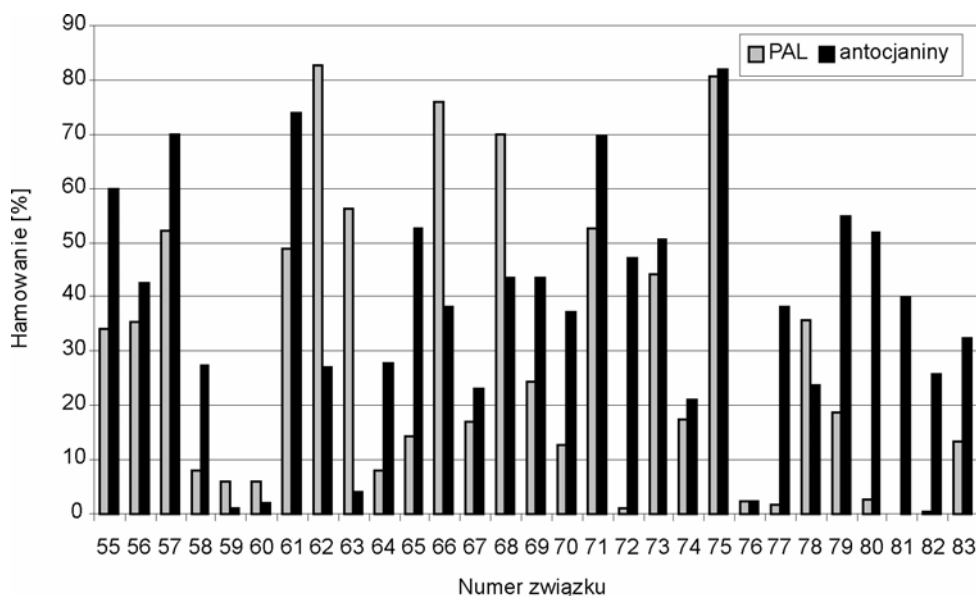
Stopień hamowania surowej amoniakolizy fenyloalaniny z gryki ( $[Phe] = 3,2 \text{ mM}$ ,  $[I] = 1 \text{ mM}$ ) oraz stopień hamowania biosyntezy antocyjanin w siewkach gryki ( $[I] = 1 \text{ mM}$ ) został wyznaczony dla całej serii związków (**55–83**) (rys. 12). Właściwości inhibitorowe analogów kwasu (*E*)-cynamonowego [84] były znacznie słabsze niż wcześniej badanych analogów substratu (**2–11** i **14–54**), przedstawiono je więc w innej postaci (rys. 12).

Wśród badanych związków można wyróżnić takie (**57**, **61** i **71**), które wyraźnie hamują biosyntezę antocyjanin w siewkach gryki, a znacznie słabiej amoniakolizę fenyloalaniny z gryki oraz takie (**62**, **63**, **66** i **68**), które znacznie silniej hamują amoniakolizę fenyloalaniny niż biosyntezę antocyjanin.

Kwas fenylopropinowy (**75**) jest wyjątkowym związkiem w całej serii, ponieważ najsilniej hamuje zarówno PAL, jak i syntezę antocyjanin (rys. 12). Dla tego inhibitora wyznaczono więc stałą inhibicji ( $K_i = 8,5 \text{ }\mu\text{M}$ ) oraz stężenie wywołujące hamowanie biosyntezy antocyjanin w 50% ( $IC_{50} = 0,18 \text{ mM}$ ) [84]. Sato i in. [78] zauważyli również, że kwas fenylopropinowy silniej niż inne analogi kwasu (*E*)-cynamonowego hamuje amoniakolizę fenyloalaniny z wilca ziemniaczanego (batata).

Z porównania zdolności hamowania PAL przez związki o różnych grupach przyłączonych do szkieletu 2-feniloetylenowego wynika, że ich aktywność inhibitorowa się zmniejsza w następującym szeregu [84]:





Rys. 12. Właściwości inhibitorowe kwasu (*E*)-cynamonowego i jego analogów (55–83) [84]

Fig. 12. Inhibition properties of (*E*)-cinnamic acid and its analogues (55–83) [84]

W podsumowaniu tej części badań można stwierdzić, że wprowadzenie reakcji enzymatycznej może być hamowane przez analogi stanu przejściowego, substratu oraz produktu, ale wydaje się, że w przypadku PAL projektowanie związków o budowie zbliżonej do struktury cząsteczki kwasu (*E*)-cynamonowego nie prowadzi do otrzymania silnych inhibitorów. Można to wyjaśnić potencjalną liczbą miejsc oddziaływania inhibitor–enzym. Analogi kwasu (*E*)-cynamonowego mają ich mniej, więc silna asocjacja z cząsteczką PAL jest mniej prawdopodobna, a stałe inhibicji są większe. Badanie inhibicji amoniakolizacji fenyloalaniny z udziałem analogów substratu (2–11) oraz produktu (55–83) w pełni potwierdza ten prosty model [84].

#### 3.4.1.4. Właściwości substratowe analogów fenyloalaniny

(*S*)-2,6-Difluorofenyloalanina otrzymana na drodze rozdzału ( $\pm$ )-2,6-difluorofenyloalaniny (12) metodą wysokorozdzielczej chromatografii na chiralnej fazie stałej, jest substratem amoniakolizacji fenyloalaniny z pietruszki poddanej ekspresji w *Escherichia coli* ( $K_m = 0,085$  mM i  $V_{max}/V_{max-(S)-Phe} = 0,85$ ); podobne działanie ma kilka innych pochodnych (*S*)-fenyloalaniny podstawionych chlorowcami w pierścieniu benzenowym [57].

Jeden z proponowanych mechanizmów działania amoniakolizacji fenyloalaniny zakłada, że nieprotonowana grupa aminowa substratu przyłącza się do elektrofilowej grupy prostetycznej MIO. Jeżeli taka reakcja rzeczywiście ma miejsce to *N,N,N*-



trimetylo-(*S*)-fenyloalanina (**13**) nie powinna być substratem tego enzymu [25]. W rzeczywistości związek ten nie okazał się substratem PAL z drożdży *Rhodotorula glutinis* oraz rekombinowanej amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki, pomimo zastosowania 100 razy większego stężenia enzymu niż zwykle i znacznego wydłużenia czasu reakcji [62]. Natomiast stwierdziliśmy, że *N,N,N*-trimetylo-(*S*)-fenyloalanina ulega bardzo powolnemu rozpadowi do kwasu (*E*)-cynamonowego i trimetyloaminy w roztworze buforu bez enzymu, w temperaturze 30°C.

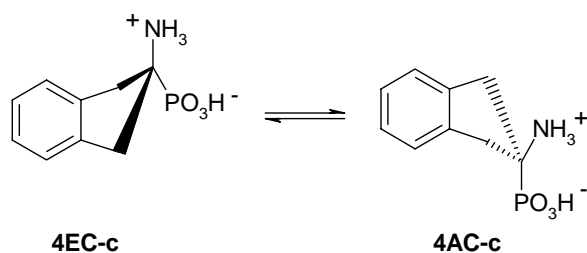
Kwas 2-aminoindano-2-karboksylowy (**5**) ( $K_m < 1 \mu\text{M}$ ) ulega reakcji eliminacji pod wpływem rekombinowanej amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki, dając kwas 1*H*-indeno-2-karboksylowy (**66**) [90].

#### 3.4.1.5. Właściwości substratowe pochodnych kwasu (*E*)-cynamonowego

Kilka pochodnych kwasu (*E*)-cynamonowego zawierających atomy chlorowców w pierścieniu benzenowym jest substratami rekombinowanej amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki, dając podstawione pochodne (*S*)-fenyloalaniny. Istotnym warunkiem odwrócenia kierunku reakcji jest bardzo duże stężenie amoniaku (5 M, buforowany dwutlenkiem węgla) w mieszaninie reagującej [57].

#### 3.4.2. Właściwości fizykochemiczne kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego

Ze względu na silne właściwości inhibitorowe kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (**4**, AIP) przeprowadziłem badania strukturalne tego związku. Ich celem było określenie struktury AIP zarówno w ciele stałym, jak i w roztworze. Kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy może istnieć w dwóch konformacjach, różniących się stanem protonowania obu grup funkcyjnych. Na schemacie 25 przedstawiono jeden z możliwych stanów protonowania konformera pseudoekwatorialnego (**4EC-c**), pozostającego w równowadze z konformerem pseudoaksjalnym (**4AC-c**). Konformer pseudoekwatorialny (**EC**) ma grupę fosfonową w pozycji pseudoekwatorialnej, konformer

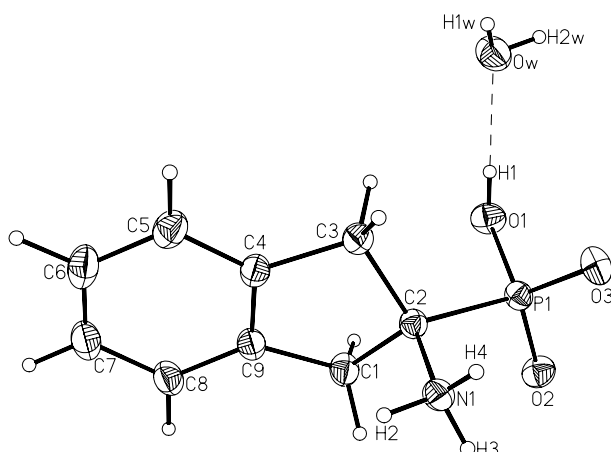


Schemat 25. Równowaga konformera pseudoekwatorialnego kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego z konformerem pseudoaksjalnym w formie obojnaczej  
Scheme 25. Pseudoequatorial–pseudoaxial exchange for the zwitterionic form of 2-aminoindane-2-phosphonic acid

pseudoaksjalny (**AC**) – w pozycji pseudoaksjalnej. Dodanie do nazwy litery c oznacza stan protonowania obu grup:  $\text{PO}_3\text{H}^-$  i  $\text{NH}_3^+$ . Założono, że grupy funkcyjne AIP mogą występować we wszystkich możliwych stanach protonowania: **(a)**  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{PO}_3\text{H}_2$ , **(b)**  $\text{NH}_2$ ,  $\text{PO}_3\text{H}_2$ , **(c)**  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{PO}_3\text{H}^-$ , **(d)**  $\text{NH}_2$ ,  $\text{PO}_3\text{H}^-$ , **(e)**  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{PO}_3^{-2}$  i **(f)**  $\text{NH}_2$ ,  $\text{PO}_3^{-2}$ .

### 3.4.2.1. Badania rentgenograficzne

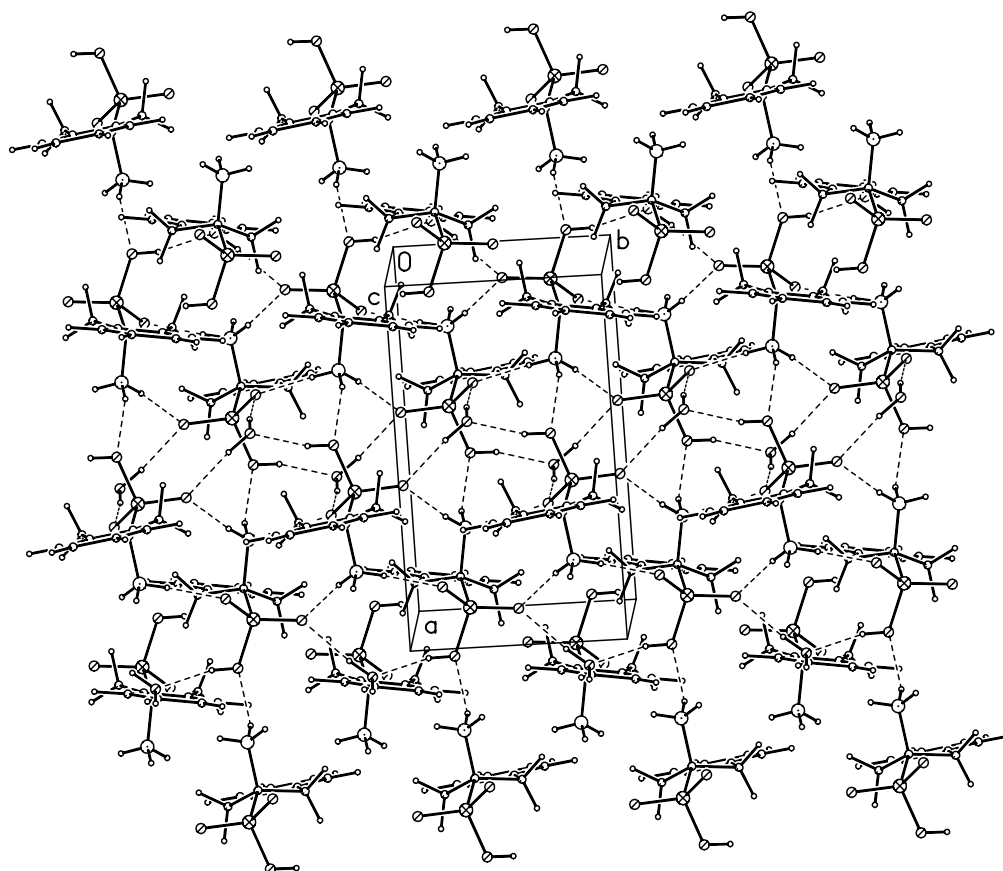
Otrzymałem dwa rodzaje monokryształów kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego nadające się do badań rentgenograficznych: trwale na powietrzu kryształy monohydratu [45, 96] i duże, nietrwałe na powietrzu kryształy trójhydratu [96]. Badania ich struktury [96] wykazały, że w obu rodzajach kryształów AIP grupa fosfonowa (w postaci grupy  $\text{PO}_3\text{H}^-$ ) zajmuje pseudoekwatorialną pozycję, a grupa aminowa (w postaci  $\text{NH}_3^+$ ) pozycję pseudoaksjalną (konformer **EC-c** na schemacie 25). W monohydracie i trójhydracie AIP stwierdzono obecność wielu wiązań wodorowych. Nie wielką różnicę zaobserwowano w konformacji grupy fosfonowej: kąt dwuścienny  $\text{O3-P1-C2-C3}$  wynosił odpowiednio  $70,2^\circ$  dla monohydratu oraz  $56,9^\circ$  dla trójhydratu AIP. Pozostałe kąty są niemal takie same. Strukturę cząsteczki monohydratu kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego otrzymaną na podstawie badań krystalograficznych przedstawiono na rys. 13.



Rys. 13. Struktura cząsteczki monohydratu kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego [96]  
Fig. 13. Molecular structure of 2-aminoindane-2-phosphonic acid monohydrate

W obu rodzajach kryształów pierścień cyklopentanowy szkieletu indanowego przyjmuje konformację koperty. Atomy  $\text{C3-C4-C9-C1}$  leżą w jednej płaszczyźnie, a kąt dwuścienny między płaszczyznami określonymi atomami:  $\text{C3-C4-C9-C1}$  i  $\text{C3-C2-C1}$  (rys. 13) w kryształach zbudowanym z cząsteczek monohydratu kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego wynosi  $176,4^\circ$ . W kryształach tych zaobserwowano też obszary hydrofilowe, w kształcie przypominającym kanały, utworzone przez grupy fos-

fonowe, z cząsteczkami wody wewnątrz nich. Obszary hydrofilowe są od siebie oddzielone obszarami hydrofobowymi zbudowanych z układów indanu. Ułożenie cząsteczek w kryształach przedstawiono na rys. 14.



Rys. 14. Sposób ułożenia cząsteczek w kryształach monohydratu kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego [96]. Linie kreskowane przedstawiają wiązania wodorowe  
 Fig. 14. Crystal packing arrangement of 2-aminoindane-2-phosphonic acid monohydrate.

Hydrogen bonds are shown as dashed lines

#### 3.4.2.2. Badania spektroskopowe

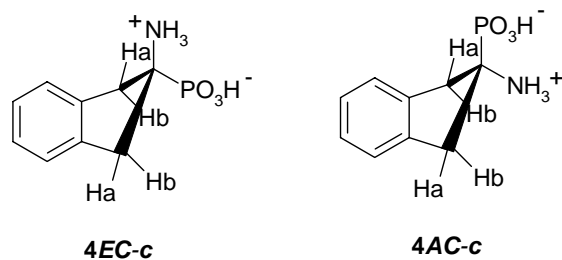
Celem badań spektroskopowych NMR było określenie struktury kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego, jego konformacji i równowagi konformacyjnej w roztworze. Zarejestrowano widma  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego w roztworze kwaśnym i zasadowym, w temperaturze 293 i 340 K [96]. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Przesunięcia chemiczne ( $\delta^a$ ) i stałe sprzężeń ( $J$ ) kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego [96]  
 Table 3. Chemical shifts ( $\delta^a$ ) and coupling constants ( $J$ ) of 2-aminoindane-2-phosphonic acid [96]

D <sub>2</sub> O + DCl (pD = 1.04)	D <sub>2</sub> O + NaOD (pD = 8.93)
$T = 293 \text{ K}$	
<sup>1</sup> H NMR: 6,57 (m, 4H, aromatyczne), 2,88 (dd, <sup>3</sup> J <sub>PH</sub> = 12,5 Hz, <sup>2</sup> J <sub>HH</sub> = 17,3 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2,51 (dd, <sup>3</sup> J <sub>PH</sub> = 4,2 Hz, <sup>2</sup> J <sub>HH</sub> = 17,3 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> )	<sup>1</sup> H NMR: 7,14 (m, 4H, aromatyczne), 3,46 (dd, <sup>3</sup> J <sub>PH</sub> = 9,3 Hz, <sup>2</sup> J <sub>HH</sub> = 17,5 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2,93 (dd, <sup>3</sup> J <sub>PH</sub> > 1 Hz, <sup>2</sup> J <sub>HH</sub> = 17,5 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> )
<sup>31</sup> P { <sup>1</sup> H} NMR: 17,84 (S)	<sup>31</sup> P { <sup>1</sup> H} NMR: 13,96 (S)
<sup>13</sup> C NMR: 137,48, 137,45, 127,31, 124,56 (aromatyczne), 59,68 (d, <sup>1</sup> J <sub>PC</sub> = 160,0 Hz, PCN), 39,12 (CH <sub>2</sub> )	<sup>13</sup> C NMR: 139,68, 139,57, 127,24, 125,06 (aromatyczne), 62,84 (d, <sup>1</sup> J <sub>PC</sub> = 143,0 Hz, PCN), 40,69 (CH <sub>2</sub> )
$T = 340 \text{ K}$	
<sup>1</sup> H NMR: 7,35 (m, 4H, aromatyczne), 3,69 (dd, <sup>3</sup> J <sub>PH</sub> = 12,6 Hz, <sup>2</sup> J <sub>HH</sub> = 17,4 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3,33 (dd, <sup>3</sup> J <sub>PH</sub> = 5,8 Hz, <sup>2</sup> J <sub>HH</sub> = 17,5 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> )	<sup>1</sup> H NMR: 7,72 (m, 4H, aromatyczne), 3,90 (dd, <sup>3</sup> J <sub>PH</sub> = 9,8 Hz, <sup>2</sup> J <sub>HH</sub> = 16,5 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3,14 (dd, <sup>3</sup> J <sub>PH</sub> = 1,9 Hz, <sup>2</sup> J <sub>HH</sub> = 16,5 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> )

<sup>a</sup>Przesunięcia chemiczne w ppm.

Wartości stałych sprzężenia (<sup>3</sup>J<sub>HP</sub>) między atomem fosforu a protonami grupy metylenowej (H<sub>a</sub> i H<sub>b</sub>, rys. 15) umożliwiają określenie odpowiednich kątów dwuściennych PCCH<sub>a</sub> i PCCH<sub>b</sub>.



Rys. 15. Oznaczenie protonów metylenowych dla obu konformerów obojnaczej formy kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego  
 Fig. 15. Description of the methylene protons of 2-aminoindane-2-phosphonic acid conformers

W tabeli 4 zestawiono obliczone (*ab initio*) i zmierzone (na podstawie otrzymanych widm) kąty dwuściennne oraz zmierzone i oszacowane (na podstawie literaturowej zależności typu krzywej Karplusa dla obliczonych kątów dwuściennych [97]) stałe sprzężeń HCCP (<sup>3</sup>J<sub>PH</sub>).

Zaobserwowano różnice między widmami <sup>1</sup>H NMR kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego w kwaśnym i zasadowym roztworze wodnym. Obliczenia teoretyczne wskazują na istnienie niewielkiej bariery między konformacjami pseudoekwatorialną i pseudoaksjalną. Szczegółowe wyniki tych obliczeń zostaną omówione w rozdz. 3.4.3.

Z wcześniejszych badań NMR [98] wynikało, że w środowisku kwaśnym grupa fosfonowa zajmuje pozycję pseudoaksjalną, a w zasadowym – pseudoekwatorialną. Wydaje się, że jest to pogląd uzasadniony, gdyż w środowisku kwaśnym grupa aminowa jest protonowana do silnie hydrofilowej, a w konsekwencji hydratowanej grupy amoniowej ( $\text{NH}_3^+$ ). Jej objętość jest więc znaczna i z tego powodu może zajmować pozycję pseudoekwatorialną, pozostawiając grupie fosfonowej pozycję pseudoaksjalną (**AC**). W środowisku zasadowym natomiast grupa aminowa ( $\text{NH}_2$ ) jest bardziej hydrofobowa niż zjonizowana grupa fosfonowa ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) i to ona właśnie zajmie pozycję pseudoekwatorialną (**EC**). Nie zauważono podwojenia sygnałów w roztworach badanych próbek (także w badaniach spektroskopowych  $^{13}\text{C}$  NMR), co świadczy o szybkim ustalaniu się stanu równowagi między konformerami pseudoaksjalnym i pseudoekwatorialnym (schemat 25).

Tabela 4. Kąty dwuściennie i stałe sprzężenia ( $^3J_{\text{PH}}$ ) zmierzone oraz oszacowane dla pseudoaksjalnego i pseudoekwatorialnego konformera kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego [96]

Table 4. Dihedral angles and coupling constants calculated and estimated for pseudoaxial and pseudoequatorial conformers of 2-aminoindane-2-phosphonic acid

Konformer	Obliczony kąt dwuścienny [°]		Zmierzone stałe sprzężenia [Hz]		Szacowane stałe sprzężenia [Hz]	
	$\phi_{\text{CCHa}}$	$\phi_{\text{CCHb}}$	$^3J_{\text{PHa}}$	$^3J_{\text{PHb}}$	$^3J_{\text{PHa}}$	$^3J_{\text{PHb}}$
<b>AC</b> <sup>a</sup>	od -19 do -26	od -139 do -140	12,5	4,2	14-17	15-17
<b>EC</b> <sup>b</sup>	35-45	72-84	9,3	1,0	10-11	1-3

<sup>a</sup>Konformer z grupą fosfonową w pozycji pseudoaksjalnej. <sup>b</sup>Konformer z grupą fosfonową w pozycji pseudoekwatorialnej.

Spośród czterech oszacowanych stałych sprzężenia tylko wartość  $^3J_{\text{PHb}}$  dla pseudoaksjalnego konformera różni się od stałej zmierzonej. Warto jednak dodać, że w tym obszarze zależności krzywej Karplusa [97] małym zmianom kątów dwuściennych odpowiada duża zmiana stałych sprzężenia. Korzystając z wykresu typu Karplusa, można oszacować, że zmniejszenie kąta dwuściennego o 20° dla kątów mniejszych od 140° powoduje zmniejszenie stałej sprzężenia o 15 Hz. Taka wartość szacowanej stałej sprzężenia (5 Hz) jest w dobrej zgodności z wartością zmierzona (4,2 Hz) [96].

Z badań NMR wynika, że konformacja kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego w roztworach wodnych zależy od pH środowiska. W środowisku kwaśnym przeważa konformacja pseudoaksjalna (**AC**), w zasadowym zaś – pseudoekwatorialna (**EC**).

Celem badań spektroskopowych IR było poznanie struktury monohydratu kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (**4**) i przypisanie pasm absorpcji poszczególnym grupom atomów. W tym celu porównano widmo IR związku (**4**) z widmem jego deuterowanego odpowiednika (**4D<sub>4</sub>**) oraz z opublikowanymi widmami podobnych związków [96]. W tabeli 5 zestawiono częstości drgań w podczerwieni cząsteczek związków **4** i **4D<sub>4</sub>** wraz z przypisaniem tych drgań poszczególnym grupom atomów.

Zarówno badania rentgenograficzne, jak i spektroskopowe w podczerwieni wskazywały na obecność w kryształach kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego cząsteczki wody [96] oraz wiązań wodorowych [45, 96].

Tabela 5. Wybrane częstości drgań w podczerwieni [ $\text{cm}^{-1}$ ] monohydratu kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (**4**) i deuterowanego kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (**4D<sub>4</sub>**) [96]

Table 5. Selected IR frequencies [ $\text{cm}^{-1}$ ] for 2-aminoindane-2-phosphonic acid monohydrate and its deuterated counterpart

Związek		Przypisanie pasma
<b>4</b>	<b>4D<sub>4</sub></b>	
3259 vs <sup>a</sup>	2462 s	$\nu_{\text{as}}(\text{H}_2\text{O})$
3169 vs	2367 s	$\nu_{\text{s}}(\text{H}_2\text{O})$
2911 s	2905 s	$\nu(\text{CH})$
2847 s	2087 s	$\nu_{\text{as}}(\text{NH}_3)$
2834 vs	2842 vs	$\nu(\text{CH})$
2739 s	1995 s	$\nu_{\text{s}}(\text{NH}_3)$
1640 m	1219 s	$\delta_{\text{sc}}(\text{H}_2\text{O})$
1620 s	1189 s	$\delta(\text{NH}_3)$
1535 vs	1114 vs	$\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3)$
1430 m	1430 m	$\delta(\text{CH})$
1228 m	1232 m	$\nu_{\text{d}}(\text{PO}_3)$
1178 m	1178 m	
1155 m	1160 m	
1067 m	1070 m	
1089 m	791 w	$\rho_{\text{t}}(\text{NH}_3)$
952 m	946 m	$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_3)$
906 m	901 m	
798 w	798 w	$\gamma(\text{CH})$
750 m	752 m	$\nu(\text{PC})$
738 m	720 m	
662 w,br	490 sh	$\rho_{\text{t}}(\text{H}_2\text{O})$
543 m	540 m	$\delta(\text{PO}_3)$
531 m	528 m	
509 m	515 sh	
376 m	367 m	$\delta(\text{PO}_3)$
335 m	321 m	

<sup>a</sup> $\nu$  – walencyjne rozciągające,  $\delta$  – deformacyjne zginające w płaszczyźnie;  $\delta_{\text{sc}}$  – deformacyjne nożycowe w płaszczyźnie,  $\rho_{\text{w}}$  – deformacyjne wachlarzowe w płaszczyźnie,  $\rho_{\text{t}}$  – deformacyjne wahadłowe w płaszczyźnie,  $\gamma$  – deformacyjne zginające poza płaszczyznę, s – silne, m – średnie, w – słabe, sh – przegięcie; br – szerokie; indeks dolny: s, as i d oznaczają: symetryczne, asymetryczne zdegenerowane.

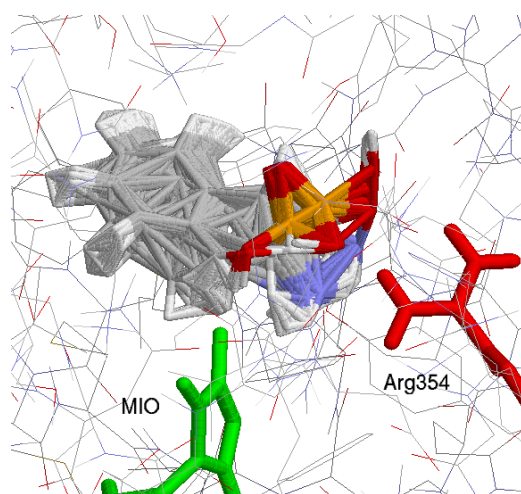
### 3.4.2.3. Badania potencjometryczne

Wyznaczone wartości stałych kwasowych ( $\text{p}K_{1-3}$ ) kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (**4**) wynoszą:  $\text{p}K_1 = 2,50$ ,  $\text{p}K_2 = 5,62$  oraz  $\text{p}K_3 = 9,37$  [96]. Wartość pierwszej

stałej kwasowej jest większa o jednostkę od typowych wartości dla kwasów 1-aminoalkilofosfonowych, dwie pozostałe wartości są zgodne z oczekiwaniami [99].

### 3.4.3. Modelowanie oddziaływania między amoniakolizą fenyloalaniny a kwasem 2-aminoindano-2-fosfonowym

Celem modelowania oddziaływania między amoniakolizą fenyloalaniny a kwasem 2-aminoindano-2-fosfonowym było poznanie struktury izolowanej cząsteczki kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego oraz jego struktury w enzymie [96]. Metodą *ab initio* Hartree–Focka, DFT/B3LYP i MP2 obliczono energię konformera pseudoekwatorialnego i pseudoaksjalnego (**EC** i **AC**, grupa fosfonowa w pozycji pseudoekwatorialnej lub pseudoaksjalnej) dla cząsteczki izolowanej oraz barierę energetyczną między konformerami dla sześciu (**a-f**) różnych stanów jonizacji, odpowiadających dwunastu różnym strukturom (stany jonizacji i ich symbole podano na s. 42) [96]. Dla każdej ze struktur trwalszym termodynamicznie okazał się konformer z grupą fosfonową w pozycji pseudoekwatorialnej (**EC**). Obliczona bariera energetyczna między konformerami jest mała i w zależności od stanu jonizacji wynosi 2–5 kcal·mol<sup>-1</sup> [96]. Struktury AIP otrzymane z obliczeń *ab initio* (długości wiązań, kąty) są zgodne w granicach błędu z otrzymanymi z pomiarów krystalograficznych. Dwie przykładowe struktury (**4EC-c** i **4AC-c**) pokazano na schemacie 25.

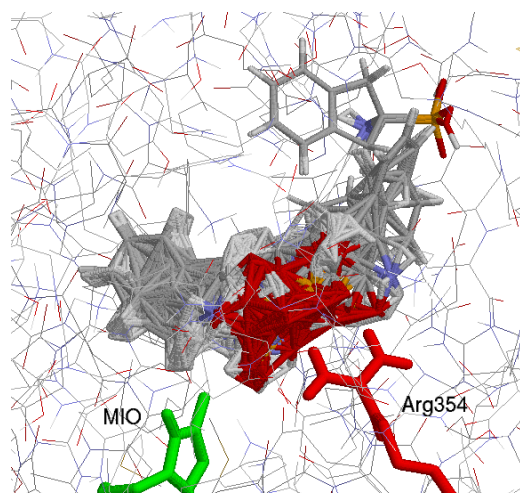


Rys. 16. Sposób wiązania pięćdziesięciu pseudoaksjalnych konformacji kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (**AC-d**) z modelem miejsca aktywnego amoniakolizy fenyloalaniny [96]

Fig. 16. Bonding of fifty pseudoaxial conformations of 2-aminoindane-2-phosphonic acid (**AC-d**) docked in the phenylalanine ammonia-lyase [96]

Do określenia struktury kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego w enzymie wykorzystano obliczenia (metodami *ab initio*) oddziaływań między modelem miejsca ak-

tywnego amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki a różnymi strukturami inhibitora (dwanaście różnych struktur kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego, od **AC-a** do **AC-f** oraz od **EC-a** do **EC-f**). Model PAL otrzymano metodą homologii [23] za pomocą zestawu programów do modelowania molekularnego. Dla każdego konformeru i stanu protonowania przeprowadzono pięćdziesiąt prób dokowania inhibitora do modelowego centrum aktywnego enzymu. Przykładowe sposoby wiązania się struktury **AC-d** kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego z modelem amoniakolizy fenyloalaniny przedstawiono na rys. 16. Jak wynika z przeprowadzonych obliczeń, struktura **AC-d** praktycznie wiąże się tylko w jeden sposób z centrum aktywnym enzymu. Podobnie jest dla pozostałych stanów protonowania (**a-c** i **e-f**) konformeru pseudoaksjalnego (**AC**) (rys. 18). W przeciwieństwie do struktury **AC-d** struktura **EC-d** wiąże się na wiele różnych sposobów (rys. 17), w przypadkowych miejscach, co świadczy o gorszym oddziaływaniu inhibitora z modelem enzymu. Podobnie oddziałują pozostałe stany protonowania (**a-c** i **e-f**) konformeru pseudoekwatorialnego (**EC**) (rys. 18).



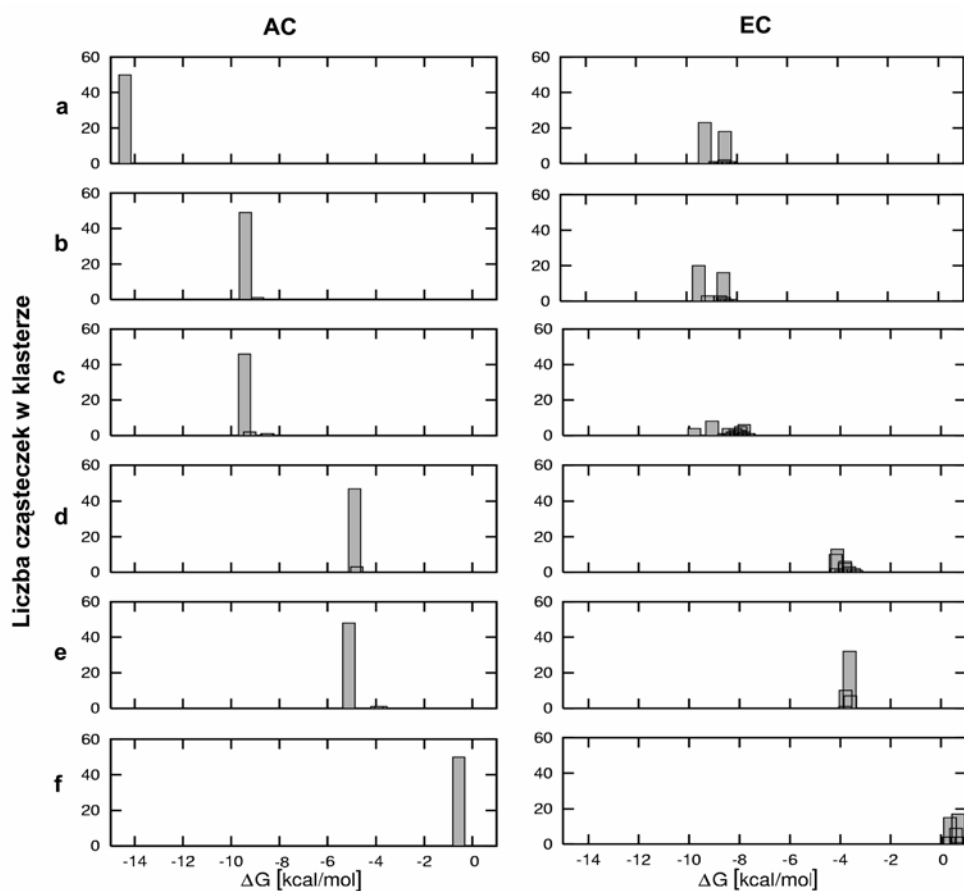
Rys. 17. Sposób wiązania pięćdziesięciu pseudoekwatorialnych konformacji kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego (**EC-d**) do modelu miejsca aktywnego amoniakolizy fenyloalaniny [96]

Fig. 17. Bonding of fifty pseudo-equatorial conformations of 2-aminoindane-2-phosphonic acid (**AC-d**) docked in the phenylalanine ammonia-lyase [96]

Miarą oddziaływania może być entalpia wiązania lub liczba i wielkość klasterów (klasterem jest zbiór struktur, gdzie średnie odchylenie kwadratowe, RMSD, nie przekracza 1 Å) tworzonych przez struktury zadokowane w 50 próbach, które odpowiadają specyficzności oddziaływania. Przyjąłem, że druga cecha jest bardziej miarodajna. Wyniki wiązania badanych struktur kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego do modelu PAL przedstawiono na rys. 18. Jedynie struktury inhibitora z grupą fosfonową w pozycji pseudoaksjalnej dla wszystkich możliwych stanów jonizacji (od **AC-a** do **AC-f**) wiążą się z modelem centrum aktywnego PAL w pobliżu grupy prostetycznej MIO



i argininy z pozycji 354. Struktury inhibitora z grupą fosfonową w pozycji pseudoekwatorialnej wiążą się w różnych miejscach centrum aktywnego PAL, a często nawet poza nim [96]. Otrzymane wyniki wskazują, że uprzywilejowany jest konformer z pseudoaksjalną grupą fosfonową (**AC**). Jednak z badań AIP w ciele stałym i w roztworze wynika, że inhibitor preferuje konformację z grupą fosfonową w pozycji pseudoekwatorialnej (**EC**), a więc nie tę, która jest preferowana przez model enzymu [96]. Po przejściu z roztworu do miejsca aktywnego enzymu AIP musi zatem zmienić konformację z pseudoekwatorialnej (**EC**) na pseudoaksjalną (**AC**). Tłumaczyłoby to stwierdzoną wcześniej [90] zależność inhibicji amoniakolizy fenyloalaniny z pietruszki dla kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego od czasu i brak takiej zależności dla podobnego, ale nie cyklicznego inhibitora PAL – kwasu (*R*)-1-amino-2-(4'-fluorofenyl)etylofosfonowego.



Rys. 18. Graficzne przedstawienie liczby i wielkości klasterów tworzonych w wyniku 50 prób dokowania cząsteczki kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego do modelu miejsca aktywnego amoniakolizy fenyloalaniny (oś  $x$  – zmiana energii swobodnej oddziaływania inhibitor–enzym w  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; oś  $y$  – liczba cząsteczek w

klasterze, litery **a–f** oznaczają różne stany protonowania grup funkcyjnych; **AC** – konformacja z pseudoaksjalną grupą fosfonową; **EC** – konformacja z pseudoekwatorialną grupą fosfonową) [96]

Fig. 18. Number and size clusters from the docking procedure of 2-aminoindane-2-phosphonic acid in the phenylalanine ammonia-lyase mode [96]

## 4. Część eksperymentalna

Większość opisanych w niniejszej pracy związków jest przedmiotem opublikowanych prac, część eksperymentalna zawiera więc jedynie opisy syntezy i właściwości fizykochemiczne związków, które nie były przedmiotem publikacji.

### 4.1. Synteza kwasu ( $\pm$ )-1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowego

*Kwas ( $\pm$ )-1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowy (9)* otrzymałem z kwasu antranilowego (schemat 11).

*1-Oksobenzocyklobuten* otrzymałem według zmodyfikowanej procedury Liebeskinda [55]. W kolbie okrągłodennej (poj. 1 dm<sup>3</sup>), wyposażonej w chłodnicę zwrotną i dopływ azotu, umieszczono 1,2-dichloroetylen (50 cm<sup>3</sup>). Do kolby przeniesiono za pomocą polipropylenowej łopatki i 1,2-dichloroetylen (50 cm<sup>3</sup>) otrzymany z kwasu antranilowego (0,25 mola) bezpośrednio przed reakcją benzenodiazoniowy-2-karboksylan [54] (suchy benzenodiazoniowy-2-karboksylan ma właściwości wybuchowe). Do zawiesiny dodano tlenek propylenu (31 cm<sup>3</sup>, 0,44 mola), świeżo destylowany chlorek winylidenu (150 cm<sup>3</sup>) oraz 1,2-dichloroetylen (400 cm<sup>3</sup>) i ogrzewano w temperaturze wrzenia pod azotem przez 15 godzin.

Mieszaninę ochłodzoną do temperatury pokojowej przesączono w celu usunięcia brązowego osadu, a przesącz odparowano pzc (temperatura łaźni ok. 50 °C pod ciśnieniem 30 mm Hg). Otrzymany olej hydrolizowano 3% kwasem siarkowym (125 cm<sup>3</sup>), który mieszano w temperaturze wrzenia przez 26 godzin. Mieszaninę poddano destylacji z parą wodną i odebrano ok. 400 cm<sup>3</sup> destylatu. Destylat ekstrahowano benzenem (2×50 cm<sup>3</sup>). Połączone ekstrakty benzenowe przemyto nasyconym roztworem solanki (2×50 cm<sup>3</sup>) i wysuszono bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Z przesączu odparowano rozpuszczalnik, a pozostałość poddano destylacji pzc. Otrzymano 1-oksobenzocyklobuten: 11,7 g (40%), t.w. 50–52°C (25 mm Hg). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CHCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,57–7,50 (m, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,45–7,32 (m, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 3,99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>C(O)). IR (film): 1768 ( $\nu_{C=O}$ ) cm<sup>-1</sup>.

Kwas ( $\pm$ )-1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowy (**9**). W trójszyjnej kolbie okrągłodennej (100 cm<sup>3</sup>) wyposażonej w mieszadło magnetyczne, wkraplacz i termometr umieszczono 1-oksobenzocyklobuten (2,90 g, 0,0245 mola), acetamid (2,90 g, 0,0491 mola) i lodowaty kwas octowy (15 cm<sup>3</sup>). Mieszany roztwór ochłodzono na łaźni wodno-lodowej do 5 °C i wkroplono w ciągu 3 minut chlorek acetylu (1,75 cm<sup>3</sup>, 0,0245 mola). Nadal mieszając, przez następne 2 godziny utrzymywano temperaturę poniżej 10 °C. Wkroplono trichlorek fosforu (2,14 cm<sup>3</sup>, 0,0245 mola), usunięto łaźnię chłodzącą i kontynuowano mieszanie przez 5 godzin. Następnie mieszaninę ogrzewano godzinę w temperaturze 60 °C i następną godzinę w temperaturze 90 °C. Z mieszaniny odparowano pzc lotne składniki, włącznie z kwasem octowym.

Do pozostałości dodano stężonego kwasu solnego (25 cm<sup>3</sup>) i wody (25 cm<sup>3</sup>) i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 20 godzin. Osad odsączono, a przesącz ekstrahowano chlorkiem metylenu (2×20 cm<sup>3</sup>). Warstwę wodną zagotowano z węglem aktywnym i po odsączeniu odparowano pzc do sucha. Pozostałość ekstrahowano dwoma porcjami roztworu stężonego kwasu solnego (0,5 cm<sup>3</sup>) w metanolu (20 cm<sup>3</sup>). Połączone metanolowe ekstrakty odparowano pzc, pozostałość rozpuszczono w wodzie (10 cm<sup>3</sup>) i naniesiono na kolumnę jonowymienną w postaci H<sup>+</sup> (Dowex 50 W, średnica złoża  $\phi$  = 2,5 cm, długość złoża  $l$  = 38 cm), którą eluowano wodą. Wyciek z kolumny analizowano metodą chromatografii cienkowarstwowej (silikażel; *n*-butanol–lodowaty kwas octowy–pirydyna–woda w stosunku 6:6:3:5 części obj.; wywoływacz – 1% roztwór ninhydryny w alkoholu izopropylowym; 130 °C;  $R_f$  = 0,77). Frakcje właściwe łączono i odparowywano pzc do sucha. Produkt krystalizowano z wody.

Otrzymano czysty kwas ( $\pm$ )-1-aminobenzocyklobutano-1-fosfonowy (**9**): 1,24 g (25%); t.t. 181–184 °C (z rozkładem). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O–DCl):  $\delta$  7,28–7,00 (m, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 3,55 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 15,1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HP</sub> = 7,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CP), 3,24 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 15,1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HP</sub> = 4,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CP). <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}NMR (121 MHz, D<sub>2</sub>O–DCl):  $\delta$  15,28 (s). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O–DCl):  $\delta$  141,76 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 10,9 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 138,92 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 5,0 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 131,13 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 128,46 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 1,1 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 123,95 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 122,59 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 57,56 (d, <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 156,4 Hz, NCP), 38,80 (CH<sub>2</sub>). IR (KBr):  $\nu_{\max}$  3181, 2810, 2433, 2107, 1611, 1534, 1150, 1086, 911, 751 cm<sup>-1</sup>. Oznaczono % N = 6,37 i % P = 14,23. Obliczona zawartość dla C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>P (monohydrat): % N = 6,45 i %, P = 14,26.

## 4.2. Właściwości fizykochemiczne analogów kwasu (*E*)-cynamonowego

W tabeli 6 zebrano właściwości fizykochemiczne analogów kwasu (*E*)-cynamonowego, których dotychczas nie opublikowano [84]. Wzory strukturalne tych związków pokazano na rys. 11.

Tabela 6. Właściwości fizykochemiczne analogów kwasu (*E*)-cynamonowego  
 Table 6. Physicochemical properties of (*E*)-cinnamic acid analogues

Numer związku	Temperatura topnienia <sup>a</sup> (rozpuszczalnik)	NMR $\delta$ [ppm], J [Hz]	IR (KBr) $\nu_{\max}$ [cm <sup>-1</sup> ]
1	2	3	4
<b>59</b>	151–153 °C (H <sub>2</sub> O)	<sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 7,55–7,45 (m, 2H, C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> ), 7,37–7,23 (m, 3H, C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> ), 7,10 (dd, <i>J</i> = 18, <i>J</i> = 21, 1H, C <sub>6</sub> CH=), 6,42 (dd, <i>J</i> = 16,5, <i>J</i> = 16,5, 1H, = CHP) <sup>31</sup> P { <sup>1</sup> H} (121 MHz, CDCl <sub>3</sub> -DMSO-d <sub>6</sub> ): 14,2 (S)	2800, 1610, 1450, 1130, 970, 740, 500
<b>60</b>	143–145 °C (H <sub>2</sub> O)	<sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> -DMSO-d <sub>6</sub> ): 7,34 (d, <i>J</i> = 9, 2H, C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> ), 7,16 (dd, <i>J</i> = 17, <i>J</i> = 22, 1H, C <sub>6</sub> CH=), 6,81 (d, <i>J</i> = 9, 2H, C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> ), 6,17 (dd, <i>J</i> = 17, <i>J</i> = 17, 1H, = CHP), 3,73 (s, 3H, C <sub>6</sub> OCH <sub>3</sub> ) <sup>31</sup> P { <sup>1</sup> H} (121 MHz, CDCl <sub>3</sub> -DMSO-d <sub>6</sub> ): 22,5 (S)	2800, 1600, 1510, 1250, 1180, 1100, 1030, 850, 800, 520, 440
<b>62</b>	170–173 °C (CH <sub>3</sub> OH)	<sup>1</sup> H (80 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8,05 (d, <i>J</i> = 2, 2H, C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> ), 7,35 (m, 2H, C <sub>6</sub> H i CH=), 6,80 (d, <i>J</i> = 8, 1H, = CH), 3,75 (s, 3H, CH <sub>3</sub> O)	3480, 1600, 1520, 1480, 1430, 1360, 1300, 1210, 1020, 980, 820, 570
<b>63</b>	74–76 °C (H <sub>2</sub> O)	<sup>1</sup> H (80 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 7,96–7,70 (m, 6H, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=), 7,35 (d, <i>J</i> = 550, 1H, PH), 6,88 (dd, <i>J</i> = 17, <i>J</i> = 17, 1H, = CHP)	2600, 1610, 1150, 980, 740, 690, 420
<b>65</b>	169–172 °C (H <sub>2</sub> O)	<sup>1</sup> H (80 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 7,75–7,10 (m, 6H, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=), 6,05 (d, <i>J</i> = 18, 1H, = CHB)	3330, 1620, 1580, 1450, 1360, 1220, 990, 740, 690, 490
<b>66</b>	250–252 °C (sublimacja)	<sup>1</sup> H (80 MHz, CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> ): 7,9–7,1 (m, 5H, C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH=), 3,62 (m, 2H, CH <sub>2</sub> )	1690, 1590, 1575, 1270, 1210, 760
<b>67</b>	187–188 °C (H <sub>2</sub> O)	<sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 7,49 (d, <i>J</i> = 7, 1H, C <sub>6</sub> H <sub>1</sub> ), 7,48 (d, <i>J</i> = 7, 1H, C <sub>6</sub> H <sub>1</sub> ), 7,33–7,19 (m, 3H, C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> i CH=), 3,52 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ) <sup>13</sup> C (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 145,4 (d, <i>J</i> = 11,5), 143,5 (d, <i>J</i> = 19,6), 140,7 (d, <i>J</i> = 190), 140,5 (d, <i>J</i> = 13,3), 127,1, 126,7, 124,6 (d, <i>J</i> = 1,9), 122,8, 40,3 <sup>31</sup> P { <sup>1</sup> H} (121 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 11,6 (S)	2800, 1550, 1180, 1080, 1000, 940, 750, 490
<b>68</b>	159–162 °C (H <sub>2</sub> O)	<sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> -DMSO-d <sub>6</sub> ): 7,52–7,43 (m, 3H, C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> CH=), 7,43 (d, <i>J</i> = 551, 1H, PH), 7,30–7,18 (m, 2H, C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> ), 3,58 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ) <sup>31</sup> P { <sup>1</sup> H} (121 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 20,0 (S)	2600, 2430, 2100, 1740, 1680, 1180, 1070, 980, 750, 710, 510, 420
<b>69</b>	163–165 °C (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )	<sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> -DMSO-d <sub>6</sub> ): 7,92 (dd, <i>J</i> = 7,4, <i>J</i> = 1,4, 1H, C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ), 7,39 (dd, 7,4, <i>J</i> = 1,4, 1H, C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ), 7,33 (t, <i>J</i> = 2, 1H, CH=), 7,21 (ddd, <i>J</i> = 7,4, <i>J</i> = 7,4, <i>J</i> = 0,9, 1H, C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ), 7,13 (ddd, <i>J</i> = 7,4, <i>J</i> = 7,4, 1,3, 1H, C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ), 3,44 (d, <i>J</i> = 1,4, 2H, CH <sub>2</sub> ) <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> -DMSO-d <sub>6</sub> ): 165,9, 144,3, 143,4, 141,1, 136,8, 126,4, 125,3, 123,7, 122,5, 38,3	3043, 2890, 2603, 1683, 1568, 1465, 1261, 771

1	2	3	4
<b>70</b>	171–172 °C (H <sub>2</sub> O)	<sup>1</sup> H (80 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8,35–7,50 (m, 8H, C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> CH=), 6,60 (dd, <i>J</i> = 17, <i>J</i> = 17, 1H, = CHP)	2900-2600, 1620, 1340, 1240, 1050, 1000, 960, 790, 610, 520, 480, 410
<b>71</b>	79–80 °C (H <sub>2</sub> O)	<sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): 7,82 (q, <i>J</i> = 1,4, 1H, CH=), 7,45–7,33 (m, 5H, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), 2,14 (d, <i>J</i> = 1,4, 3H)	3051, 2940, 2817, 2621, 2511, 1667, 1616, 1448, 1269, 1287, 1127, 769, 688, 518
<b>72</b>	64–65 °C (CH <sub>3</sub> OH)	<sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): 8,07 (bs, 1H, CH=), 7,50–7,37 (m, 5H, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), 2,44 (d, <i>J</i> = 1,0, 3H, CH <sub>3</sub> )	3058, 2975, 2807, 1518, 1322, 763, 708, 690, 505
<b>76</b>	112–115 °C	<sup>1</sup> H (100 MHz, D <sub>2</sub> O): 7,2–7,7 (m) <sup>31</sup> P { <sup>1</sup> H} (32 MHz, D <sub>2</sub> O): 9,0 ( <i>S</i> )	2800, 2200, 1450, 1130, 1020, 760, 690, 540, 500, 470
<b>80</b>	olej (kolumna chromatograficzna)	<sup>1</sup> H (80 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): 7,2 (bs, 5H, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), 4,55 (t, <i>J</i> = 7, 2H, CH <sub>2</sub> NO <sub>2</sub> ), 3,26 (t, <i>J</i> = 7, 2H, CH <sub>2</sub> )	1530, 1362, 858
<b>81</b>	56–59 °C (H <sub>2</sub> O)	<sup>1</sup> H (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): 7,20 (bs, 5H, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), 2,75 (t, <i>J</i> = 7, CH <sub>2</sub> ), 1,15 (t, <i>J</i> = 7, 2H, CH <sub>2</sub> B)	3300, 1370, 1200, 1030, 830, 750, 690

<sup>a</sup>Literaturowy sposób syntezy związku: **59**, [100]; **60**, [84]; **62**, [101]; **63**, [88]; **65**, [102]; **66**, [90]; **67**, [100]; **68**, [84]; **69**, [103]; **70**, [84]; **71**, [44]; **72**, [101]; **76**, [84]; **80**, [104]; **81**, [102].

## 5. Podsumowanie

Przez wiele lat zajmowałem się syntezą potencjalnych inhibitorów amoniakolizy fenyloalaniny, jednego z kluczowych enzymów roślinnych. W wyniku zaplanowanych syntez otrzymałem siedemdziesiąt trzy analogi fenyloalaniny, fenyloglicyny i kwasu (*E*)-cynamonowego. Związki te cechowała duża różnorodność zarówno pod względem rodzaju grup funkcyjnych, jak i struktury szkieletu węglowego. Najliczniejszą grupę stanowiły wśród nich związki fosfonowe.

Dwa spośród otrzymanych związków, kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (**4**) oraz kwas (+)-1-amino-3',4'-dichlorobenzylfosfonowy (**50**), okazały się bardzo silnymi inhibitorami zarówno amoniakolizy fenyloalaniny, jak i biosyntezy antocyjanin.

Największe znaczenie ma, moim zdaniem, otrzymany przeze mnie kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (**4**) (AIP). Związek ten jest obecnie używanym w wielu laboratoriach inhibitorem *in vivo* amoniakolizy fenyloalaniny.

Pochodne kwasu 1-aminobenzylfosfonowego, zawierające w pierścieniu różne podstawniki, otrzymałem dwiema niezależnymi metodami. Wydaje się, że najwygodniejszą metodą ich syntezy jest hydrofosfonylacja podstawionych pochodnych *N*-benzylidenodifenylometyloaminy, ale okazało się, że efekty steryczne i elektronowe mogą stanowić czynnik ograniczający zastosowanie tej metody.

Wprowadzona przeze mnie modyfikacja literaturowej syntezy analogów kwasu (*E*)-cynamonowego zawierających grupę fosfonawą (**63**, **64** i **68**) z alkenów i pentachloru fosforu pozwala skrócić ich syntezę o jeden etap. Stwierdziłem, że w opublikowanej metodzie syntezy kwasu 2-feniloetynylofosfonowego (**76**) jest błąd, polegający na tym, że zamiast związku **76** otrzymuje się kwas 2-fenilo-2-oksoetylofosfonowy.

Obliczenia teoretyczne sposobu wiązania kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego do modelu amoniakolizy fenyloalaniny wskazują, że bardziej uprzywilejowany jest konformer z pseudoaksjalną grupą fosfonową (**AC**). Badania kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego w ciele stałym, w roztworze i obliczenia dla cząsteczki izolowanej wskazują natomiast, że preferowaną konformacją jest struktura z grupą fosfonową w pozycji pseudoekwatorialnej (**EC**). Po przejściu z roztworu do miejsca aktywnego enzymu inhibitor musi zatem zmienić konformację z pseudoekwatorialnej (**EC**) na pseudoaksjalną (**AC**). Wyniki obliczeń są zgodne z wynikami badań eksperymental-

nych. Można przypuszczać, że z powodu zmiany konformacji kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy jest inhibitorem wolnowiążącym.

Badając analogi kwasu ( $\pm$ )-2-aminooksy-3-fenylpropionowego (związki **2** i **3**), wysunąłem hipotezę, że silne właściwości inhibitorowe związku macierzystego są związane z możliwością utworzenia dodatkowego wiązania wodorowego między parą elektronową atomu tlenu grupy aminooksylowej a enzymem.

W warunkach wyczerpującej *N*-metylacji (*S*)-4-nitrofenyloalaniny za pomocą *O*-metylo-*N,N'*-diizopropylomocznika zamiast oczekiwanej *N,N,N*-trimetylo-(*S*)-4-nitrofenyloalaniny powstaje sól kwasu (*E*)-4-nitrocynamonowego i trimetyloaminy. Ten produkt reakcji jest wynikiem rozpadu *N,N,N*-trimetylo-(*S*)-4-nitrofenyloalaniny w temperaturze pokojowej.

Wyniki badania aktywności inhibitorowej całej serii pochodnych kwasu 1-aminobenzylofosfonowego podstawionych w pierścieniu benzenowym pozwalają przypuszczać, że wielkość hydrofobowej kieszeni substratu w cząsteczce amoniakolizy fenylalaniny jest ograniczona.

Nie wydaje się, że projektowanie inhibitorów o budowie zbliżonej do kwasu (*E*)-cynamonowego może doprowadzić do otrzymania silnych inhibitorów amoniakolizy fenylalaniny. Spośród badanych analogów tego kwasu żaden nie miał takich właściwości.

Zgromadzone dane wiążące strukturę z właściwościami inhibitorowymi dużej liczby związków mogą być przydatne w projektowaniu inhibitorów i znaczników fotoreaktywnych amoniakolizy fenylalaniny\*.

Autor serdecznie dziękuje wszystkim Bliskim, Kolegom i Współpracownikom, którzy przyczynili się do powstania tej monografii.

---

\*Po oddaniu monografii do druku ukazał się artykuł przeglądowy na temat mechanizmu enzymatycznej reakcji eliminacji amoniaku z histydyny i fenylalaniny (Poppe L., Rétey J., Angew. Chem. Int. Ed., 2005, 44, 3668), którego autor nie mógł już uwzględnić w cytowanym piśmiennictwie.



## Literatura

- [1] CROTEAU R., KUTCHAN T.M., LEWIS N.G., *Natural products (secondary metabolites)*, [in:] *Biochemistry & Molecular Biology of Plant*, B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones, (Eds.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 2001, Chapter 24, 1250–1318.
- [2] DIXON R.A., ACHNINE L., KOTA P., LIU C.J., REDDY M.S.S., WANG L.J., *Mol. Plant Pathology*, 2002, 3, 371.
- [3] HAHNBROCK K., SCHEEL D., *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 1989, 40, 347.
- [4] SILVERMAN R.B., [in:] *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Academic Press, San Diego, 2002, 424–428.
- [5] KOUKOL J., CONN E.E., *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2692.
- [6] HANSON K.R., HAVIR E.A., *Phenylalanine ammonia-lyase*, [in:] *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, Conn E.E. (Ed.), Academic Press, New York, 1981, Vol. 7, 577–625.
- [7] XIANG L.K., MOORE B.S., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 32505.
- [8] WIGHTMAN R.H., STAUNTON J., BATTERSBY A.R., HANSON K.R., *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1972, 2355.
- [9] SMITH M.B., MARCH J., [in:] *March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure*, Wiley, New York, 2001, Chapter 17, 1299–1376.
- [10] CLAYDEN J., GREEVES N., WARREN S., WOTHERS P., [in:] *Organic Chemistry*, Oxford University Press, New York, 2001, Chapt. 19, 477–502.
- [11] MARSH H.V., HAVIR E.A., HANSON K.R., *Biochemistry*, 1968, 7, 1915.
- [12] RÖSLER J., KREKEL F., AMRHEIN N., SCHMID J., *Plant Physiol.*, 1997, 113, 175.
- [13] BOUDET A.M., *Plant Physiol. Biochem.*, 2000, 38, 1.
- [14] MARITA J.M., RALPH J., HATFIELD R.D., CHAPPLE C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 12328.
- [15] RALPH J., HATFIELD R.D., QUIDEAU S., HELM R.F., GRABBER J.H., JUNG H.-J. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 9448.
- [16] WILDERMUTH M.C., DEWDNEY J., WU G., AUSUBEL F.M., *Nature*, 2001, 414, 562.
- [17] CORDER R., DOUTHWAITE J.A., LEES D.M., KHAN N.Q., VISEU DOS SANTOS A.C., WOOD E.G., CARRIER M.J., *Nature*, 2001, 414, 863.
- [18] HUWE A., MAZITSCHK R., GIANNIS A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 2122.
- [19] QUIDEAN S., JOURDES M., SAURIER C., GLORIES Y., PARDON P., BAUDRY CH., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 6012.
- [20] DU Y., WEI G., LINHARDT R.J., *J. Org. Chem.*, 2004, 69, 2206.
- [21] OHMORI K., USHIMARU N., SUZUKI K., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 2004, 101, 12002.
- [22] RITTER H., SCHULZ G.E., *Plant Cell*, 2004, 16, 3426.
- [23] RÖTHER D., POPPE L., MORLOCK G., VIERGUTZ S., RÉTEY J., *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269, 3065.
- [24] SCHWEDE T.S., RÉTEY J., SCHULZ G.E., *Biochemistry*, 1999, 38, 5355.
- [25] CALABRESE J.C., JORDAN D.B., BOODHOO A., SARIASLANI S., VANNELLI T., *Biochemistry*, 2004, 43, 11403.
- [26] HERMES J.D., WEISS P.M., CLELAND W.W., *Biochemistry*, 1985, 24, 2959.
- [27] GLOGE A., LANGER B., POPPE L., RÉTEY J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, 359, 1.

- [28] LEWANDOWICZ A., JEMIELITY J., KAŃSKA M., ZOŃ J., PANETH P., Arch. Biochem. and Biophys., 1999, 370, 216.
- [29] HANSON K.R., HAVIR E.A., Arch. Biochem. Biophys., 1970, 141, 1.
- [30] SCHUSTER B., RÉTEY J., Proc. Natl. Acad. Sci., 1995, 92, 8433.
- [31] DONNELLY M., FEDELES F., WIRSTAM M., SIEGBAHN P.E., ZIMMER M., J. Am. Chem. Soc., 2001, 123, 4679.
- [32] CHRISTENSON S.D., LIU W., TONEY M.D., SHEN B., J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, 6062.
- [33] RÖTHER D., MERKEL D., RÉTEY J., Angew. Chem. Int. Ed., 2000, 39, 2462.
- [34] APPERT C., LOGEMANN E., HAHLBROCK K., SCHMID J., AMRHEIN N., Eur. J. Biochem., 1994, 225, 491.
- [35] BAEDERKER M., SCHULZ G.E., FEBS Letters, 1999, 457, 57.
- [36] LANGER B., LANGER M., RÉTEY J., [in:] *Advances in Protein Chemistry*, Klinman J.P., Dove J.E., (Eds.), Academic Press, New York, 2001, Vol. 58, 175–214.
- [37] RÉTEY J., Biochim. Biophys. Acta, 2003, 1647, 179.
- [38] SCHLOSS J.V., [in:] *Target Sites of Herbicides Action*, Böger P., Sadmann G., (Eds.), CRC Press, Boca Raton, 1989.
- [39] JANGAARD N.O., Phytochemistry, 1971, 13, 1765.
- [40] AMRHEIN N., GÖDEKE K.H., Plant Sci. Letters, 1977, 8, 313.
- [41] JANAS K.M., FILIPIAK A., KOWALIK J., MASTALERZ P., KNYPL J.S., Acta Biochim. Polon., 1985, 32, 131.
- [42] LABER B., KLITZ H.-H., AMRHEIN N., Z. Naturforsch., 1986, 41c, 49.
- [43] MALCOLM T.B., MORLEY J.S., J.Chem. Soc. Perkin Trans 1, 1979, 2138.
- [44] ZOŃ J., Laber B., Phytochemistry, 1988, 27, 711.
- [45] ZOŃ J., AMRHEIN N., Liebigs Ann. Chem., 1992, 625.
- [46] ZOŃ J., Pol. J. Chem., 1979, 53, 541.
- [47] ZOŃ J., AMRHEIN N., *Sposób wytwarzania nowego kwasu 2-aminoindano-2-fosfonowego*, Patent Polski, PL 163326 B1, 1994.
- [48] OLEKSYSZYN J., J. Prakt. Chemie, 1987, 329, 19.
- [49] SOROKA M., Liebigs Ann. Chem., 1990, 331.
- [50] RYCHLEWSKI T., *Synteza racemicznego kwasu 1-aminoindano-1-fosfonowego*, praca dyplomowa, Instytut Chemii Organicznej Biochemii i Biotechnologii, Politechnika Wrocławska, Wrocław, 1998, 1–43.
- [51] RYCHLEWSKI T., ZOŃ J., Phosphorus Sulfur and Silicon, 1999, 147, 463.
- [52] DERON A., GANCARZ R., GANCARZ I., HALAMA A., KUŻMA Ł., RYCHLEWSKI T., ZOŃ J., Phosphorus Sulfur and Silicon, 1999, 144–146, 437.
- [53] ZOŃ J., MIZIAK P., RYCHLEWSKI T., GANCARZ R., praca nieopublikowana.
- [54] LOGULLO F.M., SEITZ A.H., FRIEDMAN L., *Organic Syntheses*, Wiley, New York, 1973, Coll. Vol. V, 54–59.
- [55] SOUTH M.S., LIEBESKIND L.S., J. Org. Chem., 1982, 47, 3815.
- [56] ZOŃ J., AMRHEIN N., praca nieopublikowana.
- [57] GLOGE A., ZOŃ J., KÖVÁRI Á., POPPE L., RÉTEY J., Chem. Eur. J., 2000, 6, 3386.
- [58] O'DONNELL M.J., POLT R., J. Org. Chem., 1982, 47, 2663.
- [59] LÓPEZ A., MORENO-MAÑAS M., PLEIXANTS R., ROGLANS A., EZQUERRA J., PEDREGAL C., Tetrahedron, 1996, 52, 8365.
- [60] GOLDBERG Y., ABELE E., BREMANIS G., TRAPENCIERS P., GAUKHMAN A., POPELIS J., GOMTSYAN A., KALVINŠ I., SHYMANSKA M., LUKEVICS E., Tetrahedron, 1990, 46, 1911.
- [61] CAZIN J., DUFLOS J., DUPAS G., BOURGUIGNON J., QUÉGUINER G., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1989, 867.
- [62] ZOŃ J., OSIADACZ J., ROSZAK S., RÉTEY J., praca nieopublikowana.
- [63] MAIER L., DIEL P.J., Phosphorus Sulfur and Silicon, 1994, 90, 259.
- [64] ZOŃ J., AMRHEIN N., GANCARZ R., Phytochemistry, 2002, 59, 9.
- [65] SOROKA M., JAWORSKA D., SZCZĘSNY Z., Liebigs Ann. Chem., 1990, 1153.

- [66] GREEN D., PATEL G., ELGENDY S., BABAN J.A., CLAESON G., KAKKAR V.V., DEADMAN J., *Tetrahedron*, 1994, 50, 5099.
- [67] KAFARSKI P., ZOŃ J., *Synthesis of  $\alpha$ -aminoalkanephosphonic and  $\alpha$ -aminoalkanephosphinic acids*, [in:] *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids*, Kukhar V.P., Hudson H.R. (Eds.), Wiley, 2000, Chapt. 2, 33–74.
- [68] ZOŃ J., *Synthesis*, 1984, 661.
- [69] KOWALIK J., KUPCZYK-SUBOTKOWSKA L., MASTALERZ P., *Synthesis*, 1981, 57.
- [70] TYKA R., HÄGELE G., *Phosphorus Sulfur and Silicon*, 1989, 44, 103.
- [71] GREENSTEIN J.P., WINITZ M., [in:] *Chemistry of the Amino Acids*, Wiley, New York, Vol. 3, 1961, 2694–2694.
- [72] KAFARSKI P., LEJCAK B., SZEWCZYK J., *Can. J. Chem.*, 1983, 61, 2425.
- [73] OLEKSYSZYN J., SUBOTKOWSKA L., MASTALERZ P., *Synthesis*, 1979, 985.
- [74] DŻYGIEL P., RUDZIŃSKA E., WIECZOREK P., KAFARSKI P., *J. Chromatography A*, 2000, 895, 301.
- [75] KUKHAR V.P., *Asymmetric synthesis of aminophosphonic and aminoalkanephosphinic acids*, [in:] *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids*, Kukhar V.P., Hudson H.R. (Eds.), Wiley, 2000, Chapt. 5, 127–172.
- [76] ZOŃ J., *Pol. J. Chem.*, 1981, 55, 643.
- [77] JORRÍN J., LÓPEZ-VALBUENA R., TENA M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 964, 73.
- [78] SATO T., KIUCHI F., SANKAWA U., *Phytochemistry*, 1982, 21, 845.
- [79] HODGINS D.S., *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 2977.
- [80] MINAMIKAWA T., URITANI I., *J. Biochem. (Tokyo)*, 1965, 58, 53.
- [81] ZUBIETA C., KOTA P., FERRER J.L., DIXON R.A., NOEL J.P., *Plant Cell*, 2002, 14, 1265.
- [82] JEZ J.M., BOWMAN M.E., NOEL J.P., *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 2002, 99, 5319.
- [83] FERRER J.L., JEZ J.M., BOWMAN M.E., DIXON R.A., NOEL J.P., *Nature Struct. Biol.*, 1999, 6, 775.
- [84] KLUCZYK A., SZEFCZYK B., AMRHEIN N., ZOŃ J., *Pol. J. Chem.*, 2005, 79, 583.
- [85] HERBST R.M., SHEMIN D., *Organic Synthesis, Coll. Vol. II*, 1943, 1.
- [86] KLUCZYK A., *Synteza analogów kwasu (E)-cynamonowego i ich wpływ na amoniakolizację fenyloalaniny*, praca magisterska, Instytut Chemii Organicznej i Fizycznej, Politechnika Wrocławska, Wrocław, 1991, str. 1–82.
- [87] BERGMAN E., BONDI A., *Chem. Ber.*, 1933, 66, 278.
- [88] FRIDLAND S.V., EFREMOV A.I., *Zh. Obshch. Khim.*, 1978, 48, 319.
- [89] BRAND L.M., HARPER A.E., *Biochemistry*, 1976, 15, 1814.
- [90] APPERT C., ZOŃ J., AMRHEIN N., *Phytochemistry*, 2003, 62, 415.
- [91] SCHLOSS J.V., *Acc. Chem. Res.*, 1988, 21, 348.
- [92] ZOŃ J., *Prace Naukowe Centrum Biomonitoringu, Biotechnologii i Ochrony Ekosystemów Dolnego Śląska, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej*, Wrocław, 2002, 31–37.
- [93] ZOŃ J., *Phosphorus Sulfur and Silicon*, 1996, 109–110, 349.
- [94] GŁOWIAK T., SAWKA-DOBROWOLSKA W., KOWALIK J., MASTALERZ P., SOROKA M., ZOŃ J., *Tetrahedron Lett.*, 1977, 3965.
- [95] MAIER L., DIEL P.J., *Phosphorus Sulfur and Silicon*, 1994, 90, 259.
- [96] ZOŃ J., SZEFCZYK B., SAWKA-DOBROWOLSKA W., GANCARZ R., KUCHARSKA-ZOŃ M., LATAJKA R., AMRHEIN N., MIZIAK P., SZCZEPANIK W., *New J. Chem.*, 2004, 28, 1048.
- [97] BENEZRA C., *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, 95, 6890.
- [98] GANCARZ R., LATAJKA R., HALAMA A., KAFARSKI P., *Magn. Reson. Chem.*, 2000, 38, 867.
- [99] KISS T., LÁZÁR I., *Structure and stability constants of metal complexes in solution*, [in:] *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids*, Kukhar V.P., Hudson H.R. (Eds.), Wiley, 2000, Chapt. 9, 285–287.
- [100] FEDOROVA G.K., RUBAN R.N., KIRSANOV A.V., *Zh. Obshch. Khim.*, 1969, 39, 1471.
- [101] GUIRAUD C.B., LAPPIN G.R., *J. Org. Chem.*, 1953, 18, 1.
- [102] BROWN H.C., GUPTA S.K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 5249.

- [103] COLEY J.R., KAMAREWSKY V.I., *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 4448.  
[104] BHATTACHARJYA A., MUKHOPADHYAY R., PAKRASHI S.C., *Synthesis*, 1985, 886.

### **Publikacje autora zawierające rezultaty badań, które posłużyły do napisania niniejszej monografii**

- ZOŃ J., *Direct synthesis of diethyl N-carbobenzoxyaminoalkanephosphonates*, *Pol. J. Chem.*, 1979, 53, 541–542.  
ZOŃ J., *Asymmetric addition of tris(trimethylsilyl) phosphite to chiral aldimine*, *Pol. J. Chem.*, 1981, 55, 643–646.  
ZOŃ J., *Synthesis of diisopropyl 1-nitroalkanephosphonates from diisopropyl 1-oxoalkanephosphonates*, *Synthesis*, 1984, 661–663.  
ZOŃ J., LABER B., *Novel phenylalanine analogues as putative inhibitors of enzymes acting on phenylalanine*, *Phytochemistry*, 1988, 27, 711–714.  
ZOŃ J., AMRHEIN N., *Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase: 2-Aminoindan-2-phosphonic acid and related compounds*, *Liebigs Ann. Chem.*, 1992, 625–628.  
ZOŃ J., *Phosphonic analogues of phenylalanine and histidine as strong inhibitors of phenylalanine and histidine ammonia-lyases*, *Phosphorus Sulfur and Silicon*, 1996, 109–110, 349–352.  
RYCHLEWSKI T., ZOŃ J., *Synthesis of racemic 1-aminoindan-1-phosphonic acid*, *Phosphorus Sulfur and Silicon*, 1999, 147, 463–463.  
GLOGE A., ZOŃ J., KÖVÁRI Á., POPPE L., RÉTEY J., *Phenylalanine ammonia-lyase: The use of its broad substrate specificity for mechanistic investigations and biocatalysis – synthesis of L-arylalanines*, *Chem. Eur. J.*, 2000, 6, 3386–3390.  
ZOŃ J., *Amoniakoliza fenylalaniny – szeroko rozpowszechniony enzym roślinny z unikalną grupą prostetyczną*, *Prace Naukowe Centrum Biomonitoringu, Biotechnologii i Ochrony Ekosystemów Dolnego Śląska, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej*, Wrocław, 2002, 31–37.  
ZOŃ J., AMRHEIN N., GANCARZ R., *Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase: 1-aminobenzylphosphonic acids substituted in the benzene ring*, *Phytochemistry*, 2002, 59, 9–21.  
APPERT C., ZOŃ J., AMRHEIN N., *Kinetic analysis of the inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by 2-aminoindan-2-phosphonic acid and other phenylalanine analogues*, *Phytochemistry*, 2003, 62, 415–422.  
ZOŃ J., SZEFCZYK B., SAWKA-DOBROWOLSKA W., GANCARZ R., KUCHARSKA-ZOŃ M., LATAJKA R., AMRHEIN N., MIZIAK P., SZCZEPANIK W., *Experimental and ab initio calculated structures of 2-aminoindane-2-phosphonic acid, a potent inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase, and theoretical studies of its binding to the model enzyme structure*, *New J. Chem.*, 2004, 28, 1048–1055.  
KLUCZYK A., SZEFCZYK B., AMRHEIN N., ZOŃ J., *(E)-Cinnamic acid analogues as inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase and of anthocyanin biosynthesis*, *Pol. J. Chem.*, 2005, 79, 583–592.  
ZOŃ J., MIZIAK P., RYCHLEWSKI T., GANCARZ R., *Unexpected non-stability of  $\alpha$ -aminoalkylphosphonates: Limitation of their synthesis using diphenylmethylamine procedure*, praca nieopublikowana.

## Research on the syntheses and properties of inhibitors and substrates of phenylalanine ammonia-lyase

### Abstract

Studies on the design and syntheses of new inhibitors and substrates for an important plant enzyme – phenylalanine ammonia-lyase (PAL) – have been reported. In the introduction, the papers on the structure of PAL, mechanism of action and known inhibitors are reviewed. Own results concerning the methods of syntheses of new inhibitors and substrates for PAL are a crucial part of the monograph. Seventy three analogues of phenylalanine, phenylglycine and (*E*)-cinnamic acid were obtained and examined. These compounds differ in the structure of carbon skeletons as well as in their functional groups. Among them, the largest library is represented by phosphonic acids. All the compounds obtained were evaluated as inhibitors or substrates of PAL and, additionally, as inhibitors of anthocyanin biosynthesis. Two of them, namely, 2-aminoindane

-2-phosphonic acid and (+)-1-amino-3',4'-dichlorobenzyl-phosphonic acid were found to be strong inhibitors for both studied pathways. Thus introduced, 2-aminoindane-2-phosphonic acid (AIP) is now commonly used in many laboratories around the world as the preferred *in vivo* inhibitor of PAL.

1-Aminobenzylphosphonic acid derivatives possessing different substituents at the aromatic ring were obtained in amidoalkylation reaction of trivalent phosphoric acid derivatives or hydrophosphonylation of *N*-benzylidenediphenylmethylamine derivatives. The method of hydrophosphonylation is considered as the preferred one. However, in some cases, hindered diethyl 1-diphenylmethylaminoalkylphosphonates in the next acidic hydrolysis underwent decomposition to products of the retro Kabachnik–Fields reaction instead of yielding the corresponding 1-aminoalkylphosphonic acids. The values of enzyme inhibition constants ( $K_i$ ) for all studied 1-aminobenzylphosphonic acid derivatives suggest that size of a hydrophobic pocket of PAL is narrow.

Studies of (±)-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid analogues suggest that the strong inhibition of PAL by these compounds is due to the additional hydrogen bonding between the enzyme and the inhibitor.

The synthesis of analogues of (*E*)-cinnamic acid with phosphonous group from alkenes and pentachlorophosphorous, described in literature, is shortened by one step. The product formed in hydrolysis of diethyl 2-phenylethynylphosphonate is 2-oxo-2-phenylethylphosphonic acid, not as reported in the literature, 2-phenylethynylphosphonic acid. The modified synthetic procedure gives the proper product. None of twenty nine evaluated compounds with the structure related to the structure of (*E*)-cinnamic acid is a strong inhibitor of PAL. On the other hand, many substituted (*E*)-cinnamic acid derivatives were found to be substrates for *in vitro* biosynthesis of (*S*)-phenylalanine derivatives.

Theoretical studies of the mode of 2-aminoindane-2-phosphonic acid bonding to the PAL model suggest that the conformer of the inhibitor with the pseudoaxial phosphonic group is the most preferred one. All structural studies of 2-aminoindane-2-phosphonic acid (X-ray, NMR and theoretical calculation) indicate that the preferred conformation is that with the pseudoequatorial phosphonic acid group. This means that the inhibitor in the process of bonding has to change its pseudoequatorial conformation to

a pseudoaxial one. This finding is offered as an explanation for the fact that 2-aminoindane-2-phosphonic acid is a slow binding inhibitor.