

Prace Naukowe Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej
Politechniki Wrocławskiej

36

Seria: Monografie

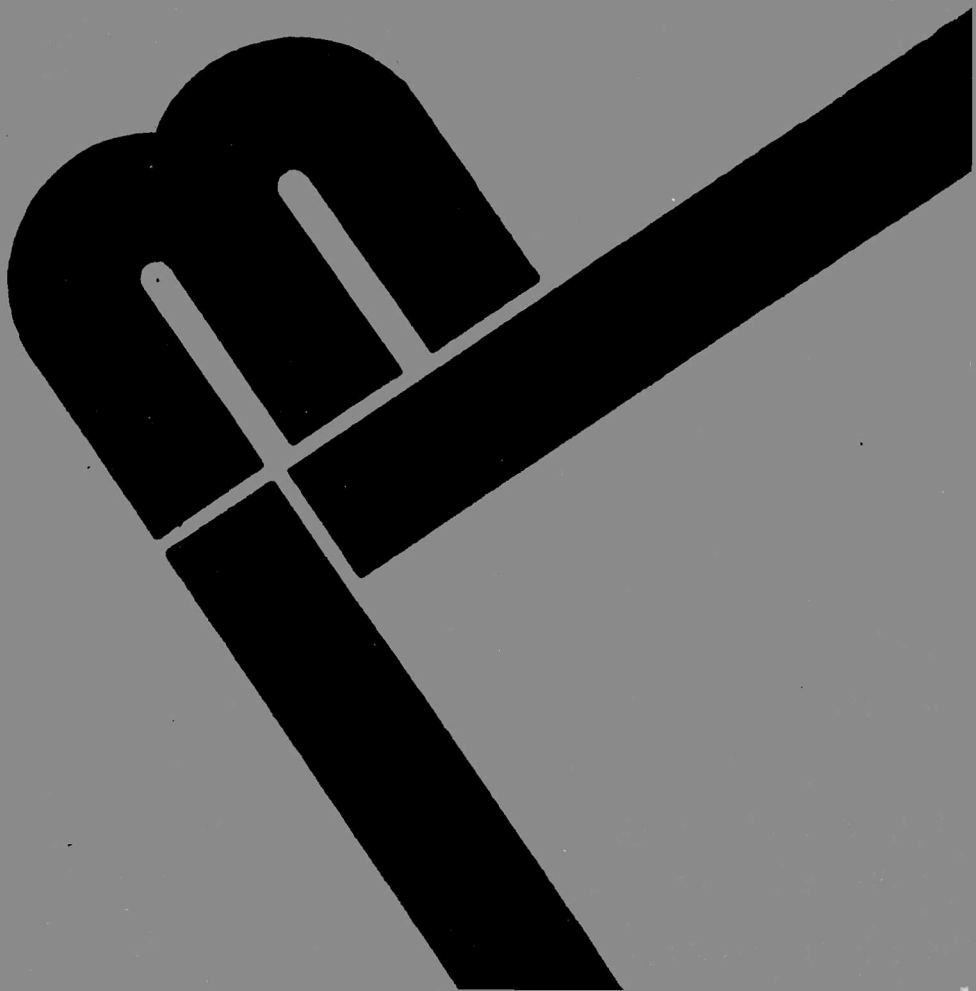
20

Paweł Kafarski

Fosfonopeptydy – synteza i stereochemia

Wrocław 1989

BIBLIOTEKA GŁÓWNA
MAGAZYN
KOWALE



PRACE NAUKOWE POLITECHNIKI WROCLAWSKIEJ

Scientific Papers of the Institute of Organic and Physical Chemistry
No. 36 of the Technical University of Wrocław No. 36

Monographs

No. 20

1989

Paweł KAFARSKI

Phosphonopeptides- synthesis and stereochemistry

Prace Naukowe Instytutu

36

Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej

Seria:

Monografie

20

Paweł Kafarski
Fosfonopeptydy
– synteza i stereochemia



Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej · Wrocław 1989

Recenzenci

Wojciech J. STEC

Czesław WASIELEWSKI

Redaktor naczelny

Jerzy CIEKOT

Redaktor naukowy

Lucjan ACHREMOWICZ

Opracowanie redakcyjne

Teresa JARMAKOWICZ

Korekta

Teresa JARMAKOWICZ

© Copyright by Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1989

WYDAWNICTWO POLITECHNIKI WROCŁAWSKIEJ

Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

ISSN 0324-9816

Nakład 250 + 60 egz. Ark. wyd. 5,5. Ark. druk. 4¼. Papier offset. kl. III 70 g, B1.
Oddano do druku w styczniu 1989 r. Druk ukończono w lutym 1989 r.
Zakład Graficzny Politechniki Wrocławskiej. Zam. nr 76/89 Cena zł 140,-

*Aminofosfonany, peptydy,
diastereomery, enantjomery*

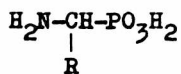
Paweł KAFARSKI*

FOSFONOPEPTYDY – SYNTEZA I STEREOCHEMIA

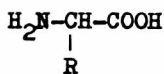
Opisano różnorakie aspekty syntezy fosfonopeptydów, to jest peptydów zawierających P-terminalne kwasy aminofosfonowe. Wolne kwasy aminofosfonowe nie są dobrymi substratami w tych syntezach, gdyż reakcji acylowania grupy aminowej towarzyszy reakcja uboczna – acylowanie anionu fosfonianowego, co powoduje nieefektywne zużycie odczynnika acylującego. Dobrymi substratami są natomiast estry dietylowe i difenylowe kwasów aminoalkanofosfonowych. Używając tych estrów jako substratów, metodą mieszanych bezwodników otrzymano ponad 150 fosfonopeptydów. Opisano także cztery sposoby otrzymywania diastereomerycznych fosfonodipeptydów. Najefektywniejszy okazał się rozdział mieszanin diastereomerycznych fosfonodipeptydów za pomocą chromatografii jonowymiennej.

1. WSTĘP

Kwasy aminoalkanofosfonowe 1 (kwasy aminofosfonowe) są analogami aminokwasów 2, których grupa karboksylowa została zastąpiona grupą fosfonową lub podobną (fosfinową, fosfonawą itp.). W tej pracy będę używał prostszej nazwy – kwasy aminofosfonowe – która jest powszechnie stosowana w literaturze źródłowej.



1



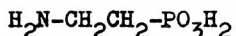
2

Już w latach czterdziestych Chavane [1] rozważał możliwość występowania tych połączeń w przyrodzie. Dokonał on też syntezy kilku kwasów

* Instytut Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław.

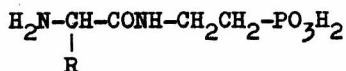
aminofosfonowych i zbadał ich podstawowe właściwości fizykochemiczne [2]-[5].

Pierwszy kwas aminofosfonowy w żywym organizmie znaleźli przypadkowo w roku 1959 Horiguchi i Kandatsu [6], zajmujący się szczegółową analizą składu chemicznego pierwotniaków przewodu pokarmowego przeżuwaczy. Poddali oni hydrolizie surową frakcję lipidową mieszaniny pierwotniaków pobranych ze żywca owcy i wyodrębnili oraz zidentyfikowali nowy aminokwas 3. Odkrywczy nazwali go ciliatyną, aby podkreślić, że został on wykryty po raz pierwszy w pierwotniakach należących do gromady Ciliata (orzęski). Nazwa ta przyjęła się w literaturze, chociaż częściej stosuje się nazwę chemiczną tego związku - kwas 2-aminoetanofosfonowy lub skrót 2-AEP (od angielskiego 2-aminoethylphosphonic acid).



3

Badania prowadzone w następnych latach wykazały, że aminokwas ten jest dość rozpowszechniony w przyrodzie, w tym także w organizmach wyższych. Spis organizmów, w których wykryto ciliatynę i inne związki z wiązaniem fosfor-węgiel oraz różne aspekty aktywności biologicznej naturalnych i syntetycznych kwasów aminofosfonowych można znaleźć w opublikowanych niedawno monografiach [7]-[9]. Ciliatyna występuje w formie niezwiązanej lub jako składnik lipidów, zwanych fosfolipidami (obszer-ny i aktualny przegląd literatury na ten temat opublikował Moschidis [10]). Stwierdzono również, że stanowi ona składnik polisacharydów i białek. Ten ostatni fakt zachęcił mnie do podjęcia w roku 1972 prób syntezy peptydów 4 zawierających kwas 2-aminoetanofosfonowy [11]. Problem ten był przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej.

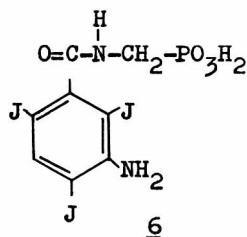


4

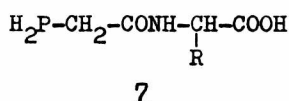
W czasie, gdy rozpoczynałem badania, było opublikowanych zaledwie kilka prac dotyczących syntezy peptydów zawierających P-terminalne kwasy aminofosfonowe [12]-[16]; opisano zaledwie dwa całkowicie odblokowane peptydy - fosfonowy analog glicyloglicyny 5 [16] i peptyd 6 [15]



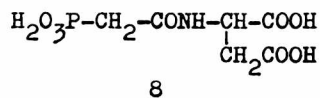
5



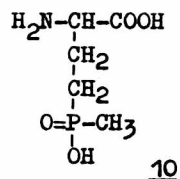
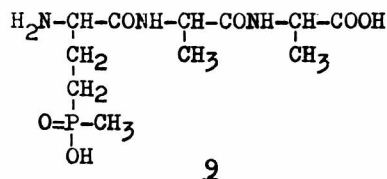
Znane były także bardzo specyficzne analogi 7, w których N-końcowa grupa aminowa dipeptydu została zastąpiona grupą fosfinową [17]. Jest to jedyna publikacja dotycząca tego typu analogii



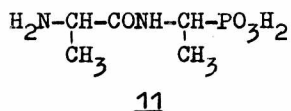
Opisano też kwas N-fosfonoacetylo-L-asparaginowy 8 (PALA), silny inhibitor karbamoiltransferazy asparaginianowej [18] i jeden z pierwszych inhibitorów skonstruowanych jako analog stanu przejściowego reakcji enzymatycznej. Synteza tego związku wymagała rozwiązania tych samych problemów wynikających ze specyficznych właściwości grupy fosfonowej, które występują podczas syntezy fosfonopeptydów



W roku 1972 odkryto fosfinotricyloalanyloalaninę 9 (bialafos), antybakteryjny peptyd produkowany przez *Streptomyces viridochromogenes* [19] i *Streptomyces hygroscopicus* [20]-[22]. Jest to fosfonopeptyd, w którym grupa fosfonowa usytuowana jest w grupie bocznej łańcucha peptydowego, zastępując γ -karboksylową resztę kwasu glutaminowego. Poznano też mechanizm działania tego antybiotyku polegający na aktywnym transporcie peptydu przez błony komórkowe bakterii, wewnątrzkomórkowej hydrolizie wiązania peptydowego i uwolnieniu fosfinotricyny 10, która silnie hamuje aktywność syntetazy glutaminy, powodując toksyczny dla bakterii wzrost poziomu amoniaku w komórce.

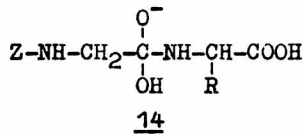
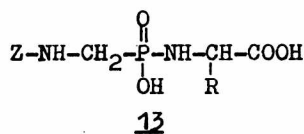
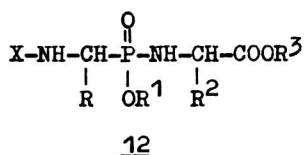


Mechanizm polegający na aktywnym transporcie, wewnątrzkomórkowej hydrolizie i uwolnieniu toksycznego aminokwasu jest ogólny dla wszystkich antybiotyków, które są krótkimi peptydami. Fakt ten jednak wyjaśniło dopiero stwierdzenie aktywności antybakteryjnej i poznanie mechanizmu działania syntetycznego antybiotyku alafosfalin 11 [23]. Peptyd ten jest aktywnie transportowany przez błonę komórkową bakterii, hydrolyzowany w komórkach, a uwalniany kwas 1-aminoetanofosfonowy (fosfonowy analog alaniny) jest silnym inhibitorem racemazy alanylowej - enzymu, który dostarcza bakteriom D-alaniny niezbędnej do budowy ściany komórkowej.



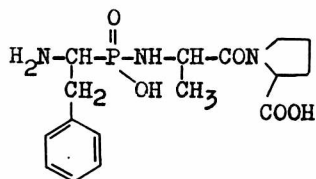
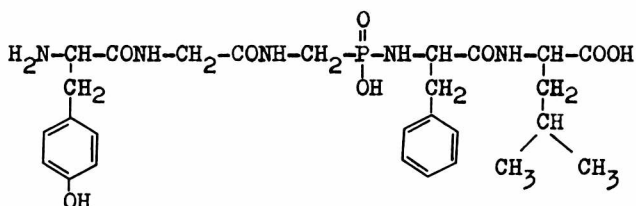
Odkrycie alafosfalin wywołało znaczny wzrost zainteresowania fosfopепtydami zawierającymi P-terminalne kwasy aminoalkanofosfonowe. Zainteresowanie to wyraża się znacznym wzrostem liczby prac dotyczących syntezy tych połączeń i badania ich aktywności biologicznej.

W roku 1972 Yamauchi [24], a w rok później Martell [25] opisali peptydy 12 zawierające N-terminalne kwasy aminofosfonowe. Peptydy te, uważane za ciekawostkę chemiczną, zyskały znaczenie w roku 1981, kiedy to Jacobsen i Bartlett [26], [27] zaprojektowali i zsyntezowali inhibitory 13 karboksypeptydazy A należące do tej klasy związków. W związkach tych fragment fosfonamidowy naśladuje ułożenie atomów wokół tetraedrycznego atomu węgla produktu pośredniego 14 enzymatycznej hydrolizy wiązania peptydowego.



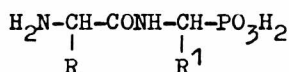
Odkrycie to spowodowało wzrost zainteresowania fosfopепtydami zawierającymi ugrupowanie fosfonamidowe, czego wynikiem było otrzymanie inhibitorów karboksypeptydazy A [28], enzymu konwertującego angiotensynę [29], [30], enkefalinazy [30], kolagenazy [31], chymotrypsyny [32] i ter-

molizyny [33]. Mimo dużej labilności wiązania fosfor-azot udało się otrzymać też takie fosfonopeptydy (na przykład 15 i 16), z których usunięto wszystkie grupy osłaniające. Są to inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę [29] i enkefalinazy [30]. Te ostatnie zawierają kwas aminofosfonowy w środku łańcucha peptydowego. Pierwsze doniesienie o możliwości syntezy takich połączeń ukazało się w roku 1975 [34].

1516

Do końca roku 1987 opublikowano ponad 300 prac opisujących metody syntezy fosfonopeptydów i ich właściwości biologiczne. Szczegółowe omówienie zawartych w nich informacji przekracza ramy tej pracy i jest niecelowe, gdyż większość pozycji z literatury obejmuje napisana przez dr Barbarę Łejczak, prof. Przemysława Mastalerza oraz przeze mnie praca przeglądowa [35], w której zawarliśmy informacje opublikowane do połowy roku 1984. Ważniejsze prace opublikowane po tym okresie zostaną omówione w dalszych częściach monografii.

W niniejszej pracy przedstawione zostaną wyniki poszukiwań prostych i efektywnych metod syntezy fosfonopeptydów 16, zawierających P-terminalne kwasy aminofosfonowe.

16

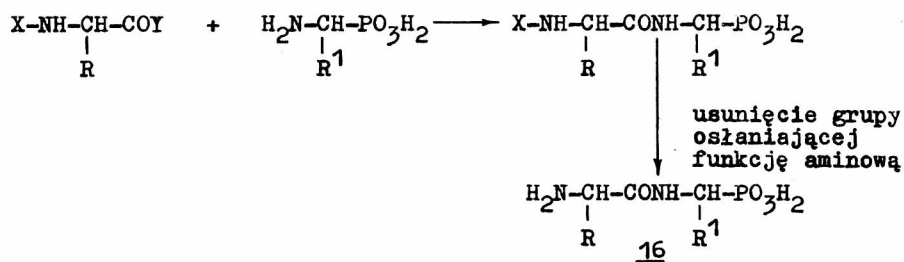
Badania te zostały podjęte głównie z dwóch powodów. Pierwszym z nich był fakt, że w wyniku odkrycia alafosfaliny dokonano syntezy i zbadano aktywność antybakteryjną ponad 300 peptydów [23], [36]-[39], w których zachowano P-końcowe fosfonowe analogi alaniny i glicyny, zmieniając je-

dynie N-końcowy, transportujący fragment peptydu; natomiast prawie wcale nie poświęcano uwagi modyfikacjom fragmentu P-terminalnego. Wiedząc, że kwasy aminofosfonowe są inhibitorami wielu enzymów ważnych dla prawidłowego wzrostu bakterii [9], postanowiliśmy zbadać, w jaki sposób zmiany struktury chemicznej aminofosfonianu wpływają na aktywność antybakteryjną peptydów 16. Drugim powodem prowadzenia tych syntez było założenie, że brak herbicydowej aktywności kwasów aminofosfonowych może być wynikiem tego, iż nie są one transportowane w tkankach rośliny. Związanie aminofosfonianu w łańcuchu peptydowym wydawało się sposobem na przeniesienie go do miejsc działania w roślinie. I rzeczywiście, fosfonopeptydy 16 okazały się interesującą klasą nowych syntetycznych fitohormonów. W związku z tym, że głównym powodem poszukiwań metod syntezy tych peptydów były problemy biologiczne, stosunkowo niewiele uwagi poświęciłem badaniom metodycznym, to jest doborowi odpowiednich grup chroniących, metodom ich wprowadzania i usuwania czy badaniu wpływu użytych reagentów (amin, czynników kondensujących, dodatków) i rozpuszczalników na wydajność syntezy fosfonopeptydów. Sporo wysiłku włożyłem natomiast w próby otrzymania diastereomerycznych peptydów 16, gdyż badania biologiczne należy wykonywać z użyciem związków o zdefiniowanej stereochemii.

2. SYNTEZA FOSFONOPEPTYDÓW ZA POMOCĄ WOLNYCH KWASÓW AMINOALKANOFOSFONOWYCH JAKO SUBSTRATÓW

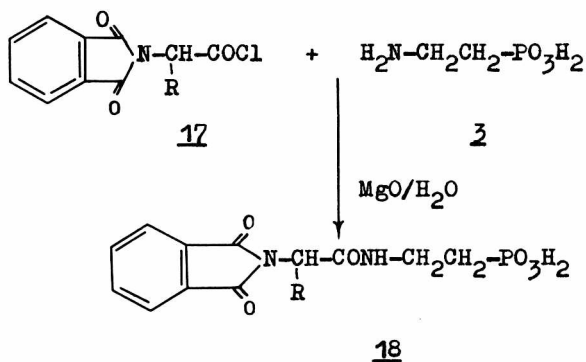
Peptydom 16 zawierającym P-terminalne kwasy aminofosfonowe poświęcono w literaturze znacznie więcej uwagi niż innym kategoriom fosfonopeptydów.

Mimo że estry dialkylowe kwasów aminoalkanofosfonowych są produktami pośrednimi w syntezach tych kwasów, estry te są zwykle trudne do wydzielenia z mieszanin poreakcyjnych i być może dlatego opisano stosunkowo niewiele metod ich otrzymywania [40]. Z drugiej strony kwasy aminofosfonowe są związkami łatwo dostępnymi i dlatego wydawało się, że atrakcyjną metodą syntezy peptydów 16 jest zwykle acylowanie tych kwasów.



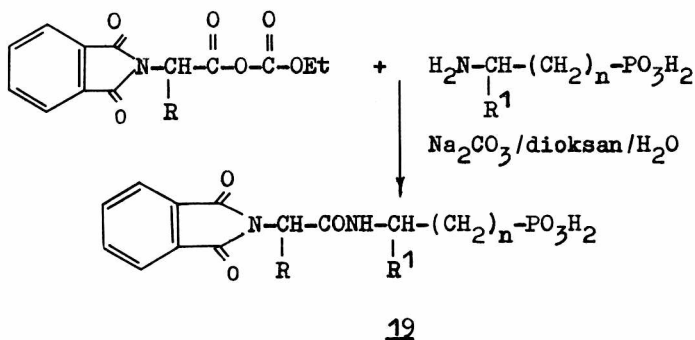
Okazuje się, że przeprowadzenie tej prostej reakcji narażać wiele trudności, a jej wydajności są z reguły umiarkowane lub niskie. Zadowolające wyniki osiągnano jedynie acylując fosfonowe analogi glicyny, alaniny i β -alaniny. Podobne trudności obserwowano podczas wprowadzania grup osłaniających: benzyloksykarbonylowej i chloroacetylowej do cząsteczki kwasu aminofosfonowego.

Podjęte przeze mnie, jeszcze w pracy doktorskiej, próby otrzymania peptydów 16 zawierających ciliatyne w reakcji acylowania soli magnezowej tego aminokwasu chlorkami ftaliloaminokwasów 17 wykazały interesującą zależność wydajności reakcji od budowy czynnika acylującego [11].

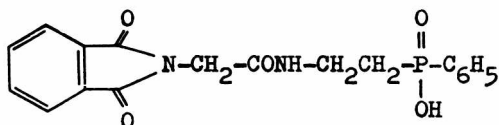


Otóż, zadowolające wydajności ftalilopeptydów 18 osiągnąłem, gdy substratami były chlorki ftaliloglicyny (17: R=H, wyd. 65%) i ftaliloalaniny (17: R=CH₃, wyd. 55%). Użycie chlorku ftalilofeniloalaniny dało produkt 18 (R=CH₂C₆H₅) z wydajnością 10%, a reakcja acylowania chlorkami ftalilowaliny (17: R=Pr^I) i ftaliloecyny (17: R=Bu^I) w ogóle nie przebiegła.

Podobny efekt obserwowałem acylując sole sodowe kwasów aminofosfonowych metodą mieszanych bezwodników w mieszaninie dioksan-woda według procedury opisanej przez Martella i współpracowników [25], [41].

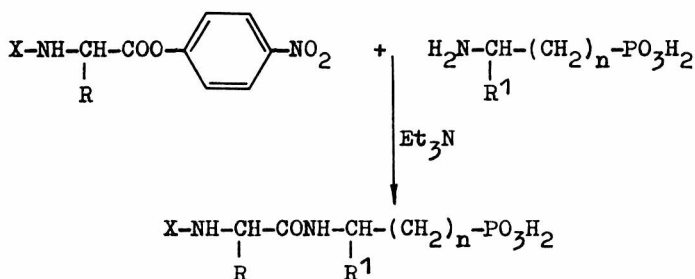


Tą metodą udało się uzyskać z dobrymi wydajnościami ftaliloglicylocilia-
tynę (19: R=R¹=H, n=1, wyd. 63%), kwas 1-(N-ftaliloglicyloamino)etano-
fosfonowy (19: R=H, R¹=CH₃, n=0, wyd. 54%), kwas (N-ftaliloalanyloamino)
benzylofosfonowy (19: R=CH₃, R¹=C₆H₅, n=0, wyd. 42%) i peptyd 20 (55%
wydajności).

20

Kwas 1-(N-ftaliloalanyloamino)-3-metylopropanofosfonowy (19: R=CH₃, R¹=
=Prⁱ, n=0) powstawał z wydajnością 20%, użycie zaś ftalilowaliny i fta-
liloleucyny nie dało produktów acylowania, a odzyskiwałem jedynie sub-
straty.

Identyczne rezultaty otrzymałem acylując ciliatynę [11] i kwas ami-
nobenzylofosfonowy estrami p-nitrofenylowymi ftalilo- i karbobenzoksy-
aminokwasów.

21

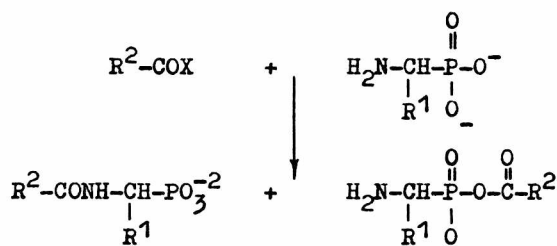
Dipeptydy 21 zawierające N-końcowe: glicynę, alaninę i β-alaninę powsta-
wały z wydajnościami 30-60%. Nie udało się natomiast otrzymać peptydów
waliny i leucyny.

Obserwacji tych dokonałem realizując pracę doktorską.

Reasumując można stwierdzić, że wolne kwasy aminofosfonowe nie są
dobrymi substratami w syntezie ich P-terminalnych peptydów, a wydajność
reakcji acylowania tych kwasów zmniejsza się wraz ze wzrostem objętości
grupy R czynnika acylującego lub grupy R¹ czynnika acylowanego i to
niezależnie od metody tworzenia wiązania amidowego.

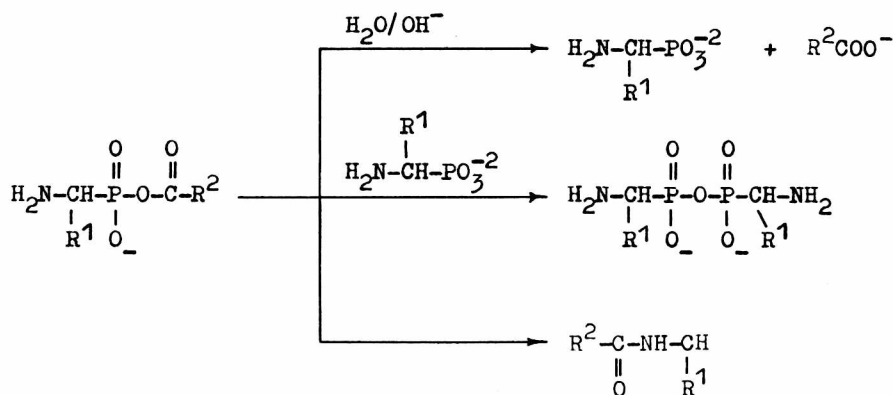
Przyczynę niepowodzenia syntez polegających na acylowaniu kwasów
aminofosfonowych wyjaśnił Soroka [42], [43]. Stwierdził on, że reakcją

konkurencyjną do acylowania grupy aminowej jest acylowanie anionu fosfonianowego, w którego wyniku powstaje mieszany bezwodnik 22.

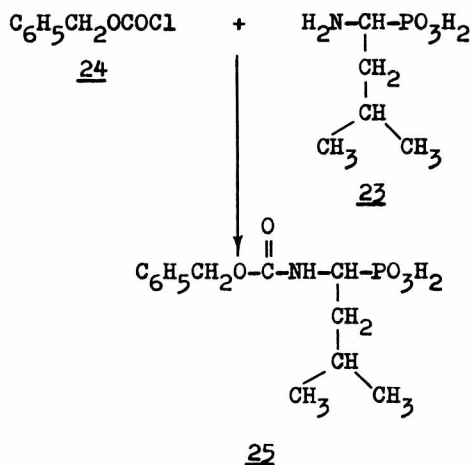


22

Jeżeli grupa aminowa jest łatwo dostępna, a czynnik acylujący nie zawiera zawady przestrzennej, to tworzenie niesymetrycznego bezwodnika nie ma większego wpływu na wydajność acylowania bez względu na to, czy kwas aminofosfonowy jest acylowany bezpośrednio, czy też bezwodnik 22 jest produktem przejściowym tej reakcji. Sytuacja zmienia się radykalnie, gdy zwiększa się zatłoczenie przestrzenne wokół grupy aminowej lub w reszcie acylującej. Wówczas reakcja acylowania grupy fosfonowej może być nawet jedyną reakcją, a powstały bezwodnik 22 reaguje dalej, dając produkty reakcji hydrolizy lub pirofosfonian.



Możliwe jest także dysproporcjonowanie mieszanych bezwodników karboksylowo-fosfonianowych, znana z literatury [44] reakcja, która w temperaturze pokojowej przebiega wolno i nie powinna stanowić konkurencji dla dwóch pozostałych. Że tak być nie musi, świadczą wyniki acylowania fosfonowego analogu 23 leucyny chlorkiem benzyloksykarbonylowym 24.



Wydatność acylowania, praktycznie niezależna od sposobu utrzymywania środowiska zasadowego (kontrolowane dodawanie roztworu wodorotlenku sodu, użycie roztworu kwaśnego węglanu czy też użycie tlenku magnezu), silnie zmienia się w zależności od czasu mieszania reagentów po dodaniu całej porcji chlorku. Gdy reakcję przerwać po dwóch godzinach (tj. prowadzić ją według standardowej procedury wprowadzania grupy benzyloksykarbonylowej do cząsteczki aminokwasu), wówczas otrzymuje się produkt z wydajnością niespełnia 15%. Przedłużenie czasu reakcji do 12-14 godzin powoduje znaczny wzrost wydajności (nawet do 50%). Świadczyłoby to, że w tym przypadku przebiega wolna reakcja dysproporcjonowania acylofosfonianu 22, który jest zaskakująco trwały w warunkach reakcji.

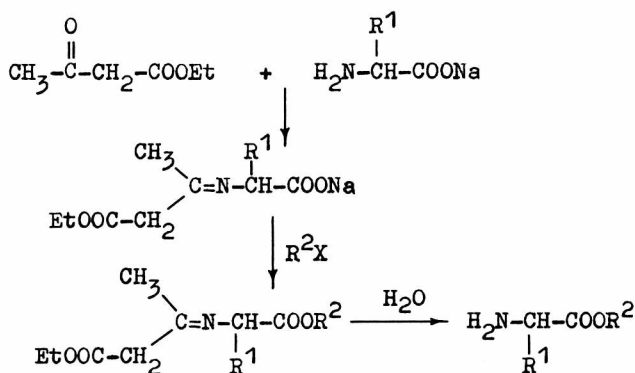
2.1. Konwersja kwasów aminoalkanofosfonowych w ich estry dietylowe

Wolne kwasy aminofosfonowe nie są dobrymi substratami w syntezie fosfonopeptydów. Znacznie lepsze wyniki uzyskuje się stosując ich estry dialkylowe lub difenyłowe, które otrzymuje się za pomocą kilku ogólnych metod, gdy substratami są aldehydy, ketony lub kwasy karboksylowe [40]. Aby zsyntezować estry kwasów aminoalkanofosfonowych o bardziej skomplikowanej budowie, trzeba często użyć specyficznych, złożonych procedur preparatywnych. Problem ten rozwiązałoby znalezienie prostej i wydajnej metody bezpośredniej estryfikacji tych kwasów, jednak metoda taka nie jest dotychczas znana. Popularnie stosowane czynniki estryfikujące zwykle albo nie reagują z grupą fosfonową, albo reagują, dając jednocześnie produkty niepożądanych reakcji z grupą aminową (na przykład diazoalkany przechodzą w N-alkiloaminofosfoniany dialkylowe).

Wszystkie opisane w literaturze metody całkowitej estryfikacji grupy fosfonowej są skuteczne tylko wtedy, gdy substratami są N-chronio-

ne kwasy aminofosfonowe. Tak więc ich otrzymywanie jest procesem wieloetapowym i wymaga wykonania trzech reakcji: acylowania grupy aminowej (co jest zwykle trudne do przeprowadzenia z wysoką wydajnością), estryfikacji otrzymanej pochodnej i selektywnego usunięcia grupy chroniącej funkcję aminową.

Ponieważ znalezienie metody estryfikacji aminofosfonianów, w której grupa aminowa nie ulegałaby żadnej przemianie, wydawało się niemożliwe, zwróciłem uwagę na prostą procedurę estryfikacji aminokwasów opracowaną przez Arendta i Kołodziejczyka [45]. Polega ona na utworzeniu zasady Schiffa między solą sodową aminokwasu a acetylooctanem etylu i alkilowaniu otrzymanej soli 26 halogenkami alkilowymi lub siarczanem dimetylowym.

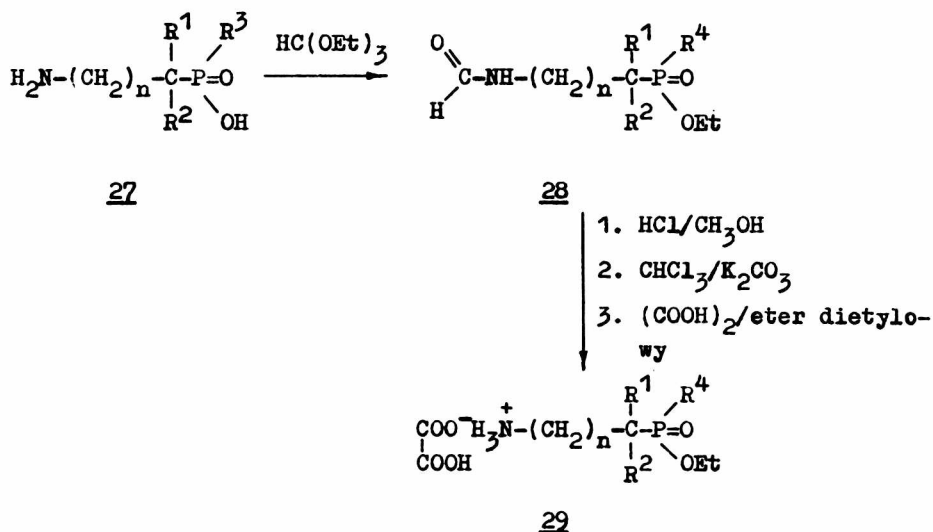


Metodę tę próbowałem zastosować do otrzymania estrów kwasu 1-aminoetanofosfonowego. Nie uzyskałem jednak spodziewanych wyników, a jedynie w przypadku użycia siarczanu dimetylowego jako środka alkilującego udało się otrzymać ester dimetylowy tego kwasu z wydajnością zaledwie 23%.

Efektywna okazała się natomiast inna metoda, polegająca na ogrzewaniu roztworów kwasów aminofosfonowych w ortomrówczanie etylu. Jednocześnie z estryfikacją grupy fosfonowej biegnie formylowanie grupy aminowej. Otrzymane (N-formyloamino)alkanofosfoniany dietylowe 28 łatwo przeprowadzić w wodoroszczawiany estrów dietylowych kwasów aminofosfonowych (szczawiany w odróżnieniu od halogenowodoroków są krystaliczne).

Wyniki zestawione w tabeli 1 wykazują, że oba etapy reakcji biegną zwykle z dużą wydajnością. Jedynie w przypadku fosfonowych analogów glicyny (27: $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$, $\text{R}^3=\text{OH}$, $n=0$) i alaniny (27: $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{CH}_3$, $\text{R}^3=\text{OH}$, $n=0$) wydajność pierwszej reakcji jest umiarkowana i odzyskuje się nieprzereagowany substrat.

Wybrane jako substraty kwasy aminofosfonowe reprezentują dość szeroką gamę modyfikacji strukturalnych, obejmując również i takie, których estry nie zostały dotychczas opisane.



T a b e l a 1

Wodorozszczawiany aminoalkanofosfonianów dietylowych i aminoalkanofosfinianów etylowych otrzymane w reakcji z ortomrówczanem etylu

R ¹	R ²	R ³	R ⁴	n	Wydajność ^a <u>28</u> (%)	Wydajność <u>29</u> (%)	Temperatura topnienia <u>29</u> (°C)
H	H	OH	OEt	0	36 ^b	62	121-22
H	H	Et	Et	0	100	69	104-6
H	Me	OH	OEt	0	55 ^c	72	101-3
H	Me	Ph	Ph	0	93	86	136-39
H	Pr ⁱ	OH	OEt	0	77	71	118-19
Me	Et	OH	OEt	0	100	78	68-69
Me	Pr ⁱ	OH	OEt	0	93	72	124-25
Pr ^c	Pr ^c	OH	OEt	0	80 ^d	82	olej
-(CH ₂) ₄		OH	OEt	0	99	71	82-83
H	Ph	OH	OEt	1	^e	50	131-32

^a Produkty są gęstymi olejami.

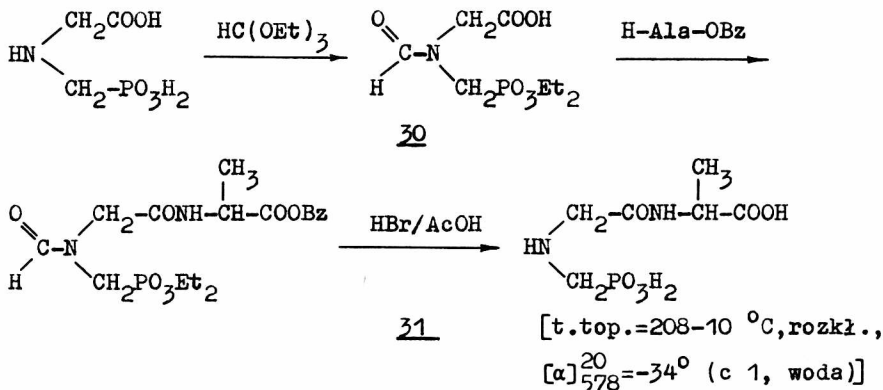
^b Odzyskiwałem kwas aminometanofosfonowy z wydajnością 64%.

^c Odzyskiwałem wyjściowy kwas 1-aminoetanofosfonowy z wydajnością 45%.

^d Odzyskiwałem wyjściowy kwas amino(dicyclopropylo)metanofosfonowy z wydajnością 10%.

^e Produkt nie był izolowany.

Warto też zauważyć, że w reakcji tej nie ulega estryfikacji grupa karboksylowa N-fosfonometryloglicyny, co umożliwiło zastosowanie otrzymanej pochodnej 30 do syntezy nie znanej dotąd N-fosfonometryloglicyloalany (31).



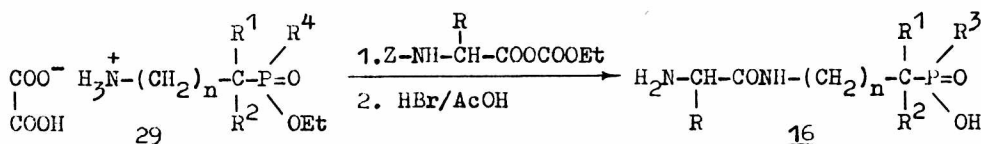
Otrzymane szczawiany 29 wykorzystalem do syntezy peptydów 16 (tab. 2) według standardowej procedury, która zostanie opisana szczegółowo w następnym rozdziale:

T a b e l a 2

Fosfopeptydy 16 otrzymane ze szczawianów 29

R	R ¹	R ²	R ³	n	Wydajność (%)	Temperatura topnienia, rozkł. (°C)	[α] ₅₇₈ ²⁰ (c 1 w wodzie) (°)
H (Gly)	H	H	OH	0	65	221-23	-
H (Gly)	H	H	Et	0	32	242-44	-
(Pro)	H	Me	OH	0	48	278-81	-40
Me (Ala)	H	Me	Ph	0	55	197-200	+4
Me (Ala)	H	Pr ⁱ	OH	0	67	264-68	+10
Bu ⁱ (Leu)	Me	Et	OH	0	32	229-31	+36
Bz (Phe)	Me	Et	OH	0	41	198-202	+28
(Pro)	Me	Pr ⁱ	OH	0	33	192-94	-9
Me (Ala)	-(CH ₂) ₄ -		OH	0	51	257-58	+3
(Pro)	H	Ph	OH	1	42	191-93	-4,5 ^a

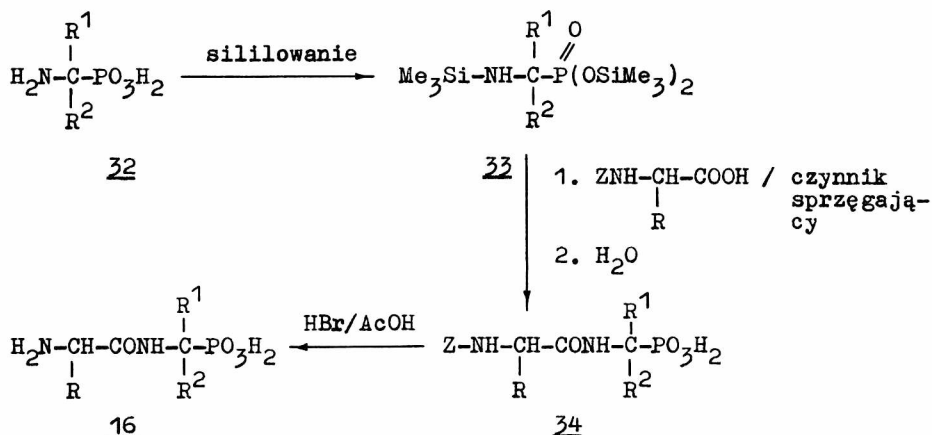
^a (c 0,67, 0,22M HCl).



Przedstawione w tej części wyniki zostały opublikowane w *Synthesis* [46] i w materiałach wydanych po konferencji: "Japan Symposium on Peptide Chemistry", która odbyła się w roku 1987 w Kobe [43].

2.2. Zastosowanie estrów trimetylosililowych w syntezie fosfonopeptydów

Fakt, że kwasy aminofosfonowe łatwo ulegają siliilowaniu [48], [49] wykorzystali Karanewsky [47] i Soroka [42], [43] do zaproponowania nowej metody ich acylowania. Siliilowe pochodne aminokwasów były już używane w syntezie klasycznych peptydów [50]-[52], ale sposób ten nie znalazł większego zastosowania. Nowa metoda jest oparta na obserwacji, że siliilowanie grupy aminowej nie przeszkadza w tworzeniu wiązania peptydowego. Dzięki prostocie wykonania reakcji wydawała się ona najlepszą z opisanych metod syntezy fosfonopeptydów.



Ponieważ badania te nie były przez Sorokę kontynuowane, postanowiłem sprawdzić, czy ta niezwykle atrakcyjna metoda ma charakter ogólny. Stwierdziłem, że jest to dobry sposób otrzymywania tych peptydów, gdy substratami są nierozgałęzione kwasy aminofosfonowe ($\underline{32}$: $\text{R}^1=\text{H}$), a wydajności reakcji są porównywalne z wydajnościami otrzymywanymi w syntezach, w których substratami są estry tych kwasów (tab. 3). Niestety, nie nadaje się ona do acylowania rozgałęzionych kwasów fosfonowych ($\underline{32}$: $\text{R}^1=\text{alkil}$) oraz kwasów zawierających grupę karboksylową w łańcuchu bocznym. Tak więc, gdy substratami były kwasy: 1-amino-1-metyloetanofosfonowy ($\underline{32}$: $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{CH}_3$), 1-amino-1-metylopropanofosfonowy ($\underline{32}$: $\text{R}^1=\text{CH}_3$, $\text{R}^2=\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1-amino-1,2-dimetylopropanofosfonowy [$\underline{32}$: $\text{R}^1=\text{CH}_3$, $\text{R}^2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$] i 1-aminocykloheksanofosfonowy [$\underline{32}$: R^1 , $\text{R}^2=-(\text{CH}_2)_4-$] oraz kwas 1-amino-3-fosfopropionowy ($\underline{32}$: $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{CH}_2\text{COOH}$) i N-fosfonometyloglicyna nie udało się otrzymać pożądaných peptydów.

T a b e l a 3

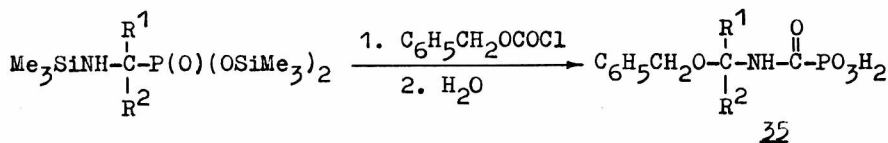
Fosfonodipeptydy 16, karbobenzoksyfosfonodipeptydy 34 oraz karbobenzoksyaminofosfoniany 35 otrzymane przez siliłopochodne

R	R ¹	R ²	Wydajność (%)	Czynnik siliłujący	Rozpuszczalnik	Metoda acylowania
Fosfonodipeptydy <u>16</u>						
H (Gly)	H	Me	94	HMDSN ^a	CH ₃ CN	AE ^b
Me (Ala)	H	Me	92	HMDSN	CH ₃ CN	AE ^b
			78	TMSCl/Et ₃ N	CH ₃ CN	AE ^b
Me (Ala)	H	Pr ⁱ	58	TMSCl/Et ₃ N	CHCl ₃	MCA
Bz (Phe)	H	Bu ⁱ	54	CF ₃ CON(TMS) ₂	CHCl ₃	MCA
Pr ⁱ (Val)	H	Bu ⁱ	61	TMSCl/Et ₃ N	CHCl ₃	MCA
H (Gly)	H	Bz	87	HMDSN	CH ₃ CN	AE ^b
Karbobenzoksyfosfonodipeptydy <u>34</u>						
Me (Ala)	H	Pr ⁱ	57	TMSCl/Et ₃ N	CHCl ₃	MCA
Pr ⁱ (Val)	H	Et	86	TMSCl/Et ₃ N	CHCl ₃	MCA
Bu ⁱ (Leu)	H	Et	42	TMSCl/Et ₃ N	CHCl ₃	MCA
			57	TMSCl/Et ₃ N	THF	MCA
			52	TMSCl/Et ₃ N	DMF	MCA
			47	TMSCl/Et ₃ N	CH ₃ CN	MCA
Karbobenzoksyaminoalkanofosfoniany <u>35</u>						
	H	Bu ⁱ	53	TMSCl/Et ₃ N	CHCl ₃	
			85	CF ₃ CON(TMS) ₂	CHCl ₃	
			3	TMSCl	CHCl ₃	
	H	Me	85	TMSCl/Et ₃ N	CHCl ₃	
	Me	Et	3,5	TMSCl/Et ₃ N	CHCl ₃	
	Me	Pr ⁱ	0	TMSCl/Et ₃ N	CHCl ₃	

^a Zastosowane skróty: HMDSN - heksametylodisilazan, TMSCl - trimetylochlorosilan, AE - metoda aktywnych estrów (estry p-nitrofenylo- we), MCA - metoda mieszanych bezwodników (z użyciem chloromrówczanu e- tyłu).

^b Wyniki otrzymane przez Sorokę.

Acylowanie siliłowych pochodnych 33 jest także dogodną metodą syn- tezy karbobenzoksyaminofosfonianów 35 i karbobenzoksyfosfonodipeptydów 34, produktów przejściowych w syntezie peptydów 16 (tab. 3).



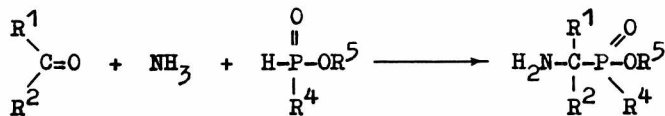
Także i w tym przypadku wydajności acylowania rozgałęzionych aminokwasów są niezadowolające lub reakcja nie zachodzi. Może to być wynikiem faktu, że otrzymane w reakcji silylowania pochodne $\beta\beta$ (R=alkil) zawierają zbyt duże przeszkody przestrzenne utrudniające dostęp czynnika acylującego do grupy aminowej.

Opisane w tym podrozdziale wyniki zostały zasygnalizowane w komunikacie [43] zaprezentowanym na JASPEC 87.

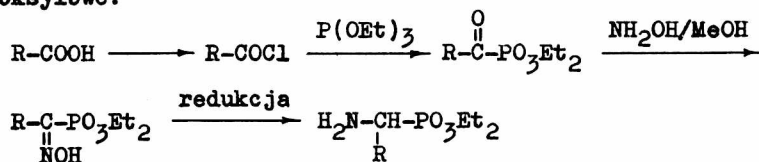
Oba opisane sposoby otrzymywania fosfonopeptydów, polegające na tym, że kwas aminofosfonowy w prosty sposób przeprowadza się w pochodną łatwo ulegającą acylowaniu, są metodami komplementarnymi. Użycie ortomrówczanu daje lepsze wyniki, gdy kwas aminofosfonowy jest rozgałęziony, zastosowanie czynników silylujących jest zaś efektywne, gdy mamy do czynienia z kwasami aminofosfonowymi nie zawierającymi zawady przestrzennej. Dysponując tymi dwiema metodami, można otrzymać fosfonopeptydy zawierające dość dużą różnorodność P-terminalnych kwasów aminofosfonowych. Jednakże są one konkurencyjne w stosunku do metod, w których substratami są estry kwasów aminofosfonowych, tylko wówczas, gdy synteza tych kwasów jest łatwiejsza niż otrzymanie ich estrów dialkylowych lub difenylowych.

3. ESTRY DIALKILOWE KWASÓW AMINOALKANOFOSFONOWYCH W SYNTEZIE FOSFONOPEPTYDÓW

Ponieważ wolne kwasy aminofosfonowe nie są dobrymi substratami w syntezie fosfonopeptydów, znacznie więcej uwagi poświęcono zastosowaniu ich estrów dialkylowych. Głównym ograniczeniem jest tu mała dostępność tych estrów. W literaturze opisano kilkanaście ogólnych metod syntezy tych połączeń, przy czym tylko dwie z nich są powszechnie stosowane. Pierwszą jest metoda Kabaczniaka i Miedwied [53]–[56], w której substratami są aldehydy lub ketony:



Drugą metodę opracowali Asano [57] i Kowalik [58]. Substratami są kwasy karboksylowe:



Estry używane do syntez fosfonopeptydów otrzymywałem głównie tymi właśnie metodami. Wiele otrzymanych przeze mnie estrów to związki nowe i dotychczas nie opisane.

Mimo że w chemii peptydów opisano ponad 50 sposobów tworzenia wiązania amidowego, w syntezie fosfonopeptydów stosuje się zaledwie kilka z nich (tab. 4), a powszechnie wykorzystuje się tylko dwie: metodę dicykloheksylokarbodiimidową (DCC) i metodę mieszanych bezwodników (MCA). Są to zresztą dwa najpopularniejsze sposoby tworzenia wiązania peptydowego.

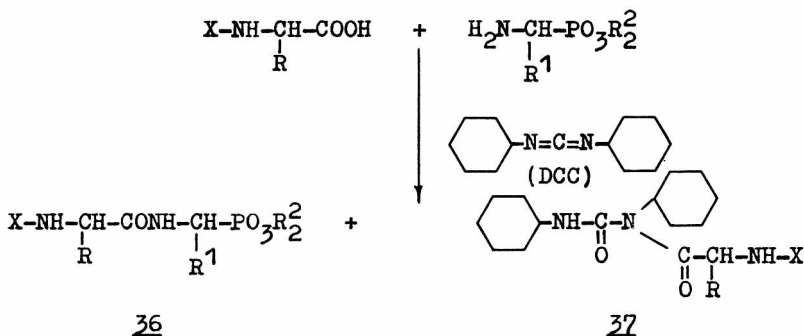
T a b e l a 4

Metody tworzenia wiązania peptydowego zastosowane w syntezie fosfonopeptydów z użyciem jako substratów 1-aminoalkanofosfonianów dialkylowych

N-chroniony aminokwas	Aminofosfonian	Metoda tworzenia wiązania peptydowego/czynnik kondensujący	Pierwsze doniesienie w literaturze
$\begin{array}{c} \text{X-NH-CH-COOH} \\ \\ \text{R} \end{array}$ <p>X = Z, Boc, Phth</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N-CH-PO}_3\text{R}^2 \\ \\ \text{R}^1 \end{array}$ <p>R² = Me, Et</p>	MCA/ClCOOEt	[13]
$\begin{array}{c} \text{X-NH-CH-COOH} \\ \\ \text{R} \end{array}$ <p>X = Z, Phth</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N-CH-PO}_3\text{R}^2 \\ \\ \text{R}^1 \end{array}$ <p>R² = Me, Et</p>	DCC/dicykloheksylokarbodiimid	[61]
$\begin{array}{c} \text{Z-NH-CH-COOH} \\ \\ \text{R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N-CH-PO}_3\text{R}^2 \\ \\ \text{R}^1 \end{array}$ <p>R² = Me, Et</p>	AE/N-hydroksyimid kwasu bursztynowego	[90]
$\begin{array}{c} \text{Z-NH-CH-COCl} \\ \\ \text{R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N-CH-PO}_3\text{Et}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	metoda chlorków kwasowych	[80]

Podstawniki R i R¹ to grupy alkilowe, aryłowe i aralkilowe.

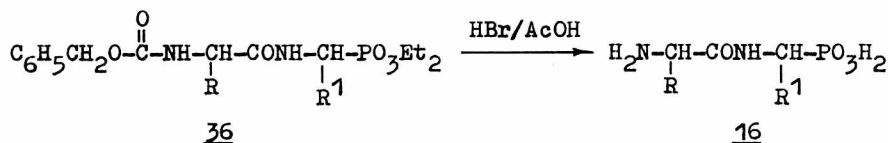
Próby syntezy peptydów ciliatyny [11] a także i innych kwasów aminofosfonowych wykazały, że metodą, w której używa się DCC jako czynnika sprzęgającego, oprócz pożądaných peptydów 36 otrzymuje się produkty reakcji ubocznej - dicykloheksylomoczniki 37, i to niekiedy z niespotykanie wysokimi wydajnościami (nawet do 40%).



Obserwacje te zostały potwierdzone przez Arendta [59] i Kupczyk-Subotkowską [60], którzy stwierdzili także, że dodanie N-hydroksyimidu kwasu bursztynowego do mieszaniny reakcyjnej znacznie ogranicza przebieg niepożądanego reakcji powstawania moczników 37.

Znacznie lepsze wyniki uzyskałem za pomocą metody mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych, umożliwiającą otrzymanie w gramowych ilościach fosfonopeptydów o dużej różnorodności strukturalnej, co jest niezwykle istotne dla celów, w których były one syntezowane. Wyniki otrzymane tą metodą zostaną omówione szczegółowo w następnych podrozdziałach.

Trwałość estrów fosfonowych spowodowała, że najwięcej wysiłku poświęcono poszukiwaniom metod selektywnego lub całkowitego usuwania osłon z grup aminowej i fosfonowej fosfonopeptydów 36 [35]. Mimo to właściwie tylko dwa sposoby są na tyle efektywne, że znalazły szersze zastosowanie. Jednym z nich jest jednoczesne usunięcie grupy benzyloksykarbonylowej z N-końca peptydu i obu reszt estrowych z grupy fosfonowej za pomocą bromowodoru w lodowatym kwasie octowym.



Do całkowitego przebiegu reakcji acydolizy konieczne są jednak dość drastyczne warunki, to jest podwyższona temperatura (do 50 °C) lub przedłużony czas reakcji. Niekiedy powoduje to zerwanie wiązania peptydowego.

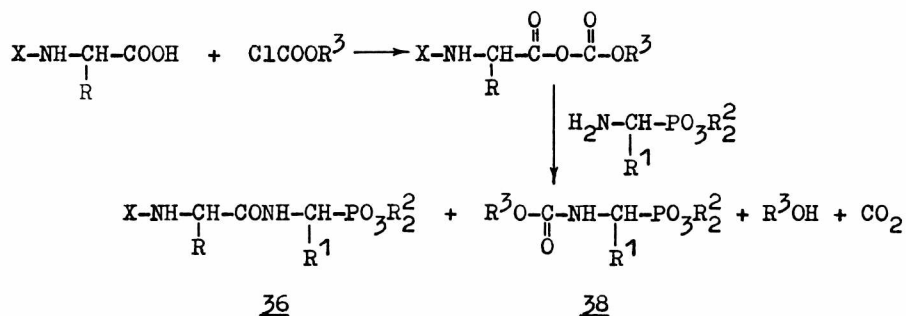
Drugim powszechnie stosowanym sposobem jest selektywne usuwanie grupy benzyloksykarbonylowej metodą wodorolityczną z użyciem katalizatora palladowego.

Niestety, nie udało się dotychczas znaleźć dobrej metody przeprowadzania fosfonianów dialkylowych w wolne kwasy bez naruszenia grup

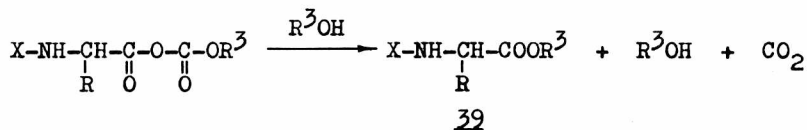
chroniących grupę aminową. Doniesienia dotyczące zastosowania w tym celu trimetylohalogenosilanów [9] należy traktować ostrożnie, gdyż znane są też opisy użycia tych związków do jednoczesnego usuwania grup chroniących funkcje aminową i fosfonową.

3.1. Zastosowanie mieszanych bezwodników w syntezie fosfopепtydów

Metoda mieszanych bezwodników polega na acylowaniu estrów aminokwasów przez bezwodniki utworzone z N-chronionych aminokwasów (lub peptydów) i chloromrówczanu alkilu:

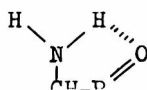


Nie jest to reakcja prosta, gdyż acylowanie może dać pożądaną peptyd 36 lub niepożądaną produkt - uretan 38. Dodatkową komplikację stanowi też fakt, że czynnik acylujący może także reagować z powstającym w wyniku reakcji alkoholem, co prowadzi do produktu estryfikacji 39



W chemii peptydów zapobiega się tym niekorzystnym reakcjom przez stosowanie chloromrówczanu izobutyli, w którym grupa R^3 jest rozbudowana przestrzennie, co utrudnia atak grupy aminowej na węglanowy atom węgla, a także poprzez prowadzenie reakcji w niskiej temperaturze, co ułatwia powstawanie peptydu, a ogranicza estryfikację.

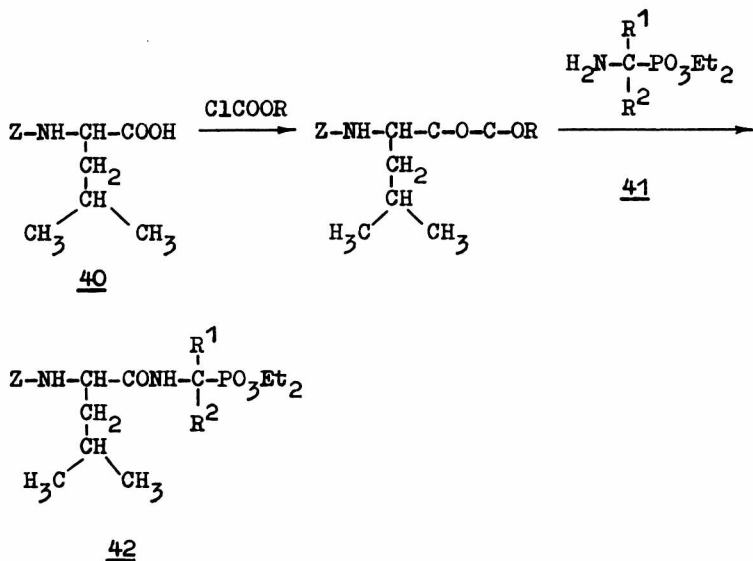
Aminofosfoniany dialkylowe ulegają acylowaniu znacznie trudniej niż odpowiednie estry aminokwasów. Gilmore [61] tłumaczy to osłanianiem grupy aminowej przez resztę fosfonową po utworzeniu wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego:



Mniejsza reaktywność grupy aminowej aminofosfonianów wymagała więc optymalizacji procedury tworzenia wiązania peptydowego metodą mieszanych bezwodników.

3.1.1. Wpływ warunków reakcji acylowania aminofosfonianów dietylowych metodą mieszanych bezwodników na wydajność fosfonopeptydów

Aby opracować procedurę syntezy fosfonopeptydów metodą mieszanych bezwodników, podjąłem badania wpływu warunków reakcji na jej wydajność. Badania prowadziłem, sprzęgając karbobenzoksy-L-leucynę 40 z 1-amino-2-(4-metoksyfenylo)etanofosfonianem dietylowym (41: $R^1=H$, $R^2=4-CH_2OC_6H_4$) oraz 1-amino-1-metyloetanofosfonianem dietylowym (41: $R^1=R^2=CH_3$). Estry te zostały użyte w formie wodoroszczawianów. Wcześniej-sze badania wykazały, że uwalniany z nich kwas szczawiowy nie wpływa na przebieg i wydajność reakcji tworzenia wiązania peptydowego.



Reakcję prowadziłem w czterech rozpuszczalnikach i stwierdziłem, że wpływ użytego rozpuszczalnika na wydajność reakcji jest niewielki (tab. 5).

Ponieważ najmniejsze wydajności dało użycie chlorku metylenu, dalsze badania prowadziłem w tym rozpuszczalniku, spodziewając się, że zmiany wydajności reakcji w wyniku zmian jej warunków będą w tym przypadku najbardziej wyraźne. Ograniczyłem się też do reakcji sprzęgania karbobenzoksy-L-leucyny z 1-amino-2-(4-metoksyfenylo)etanofosfonianem dietylowym. Zastosowanie chloromrówczanu etylu i chloromrówczanu izobu-

Tabela 5

Wpływ rodzaju użytego rozpuszczalnika na wydajność fosfonopeptydu 42

Rozpuszczalnik	Wydajność peptydu <u>42</u> (%) dla:	
	R ¹ =H i R ² =4-CH ₃ OC ₆ H ₄	R ¹ =R ² =CH ₃
CH ₂ Cl ₂	78,5	41
CHCl ₃	86	50
THF	96	53
DMF	78,5	40

Tabela 6

Wpływ warunków reakcji na wydajność powstawania 1-(N-benzyloksykarbonyloleucyloamino)-2-(4-metoksyfenylo)etanofosfonianu dietylowego 42

Rozpuszczalnik	Czynnik sprzęgający	Zasada	Wydajność (%)
CH ₂ Cl ₂	ClCOOEt	Et ₃ N	78
CH ₂ Cl ₂	ClCOOBu ⁱ	Et ₃ N	71
CH ₂ Cl ₂	ClCOOEt/HOBT	Et ₃ N	64
CH ₂ Cl ₂	ClCOOBu ⁱ /HOBT	Et ₃ N	64
CH ₂ Cl ₂	ClCOOEt	N-metylomorfolina	80
CH ₂ Cl ₂	ClCOOEt	DMAP ^a	37
CH ₂ Cl ₂	ClCOOEt	DBU	34
CH ₂ Cl ₂	ClCOOEt	DBN	52

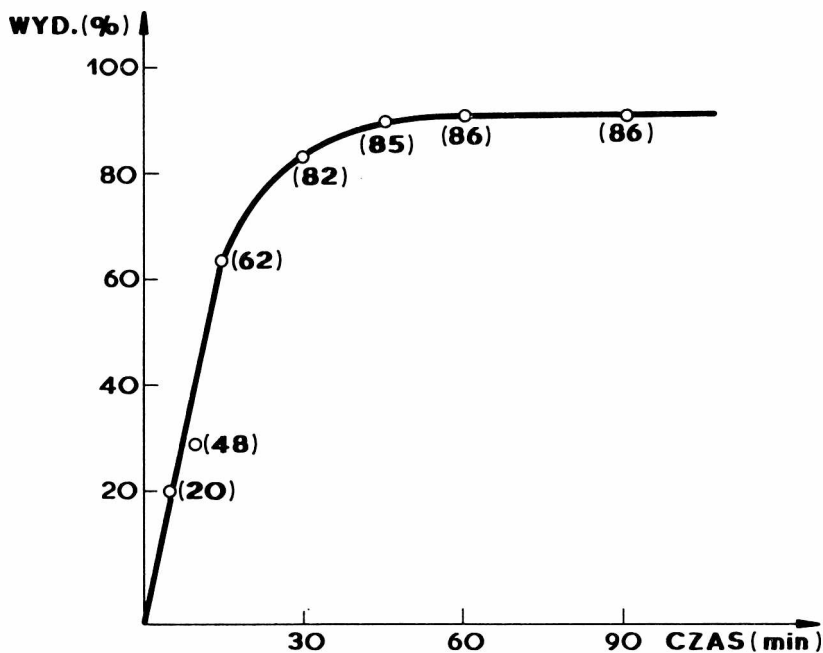
^a Użyte skróty: DMAP - 4-(N,N-dimetyloamino)pirydyna; DBU - 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undeken-7; DBN - 1,5-diazabicyklo[4.3.0]nonen-5

tylu nie wpływa na wydajność reakcji (tab. 6). Co więcej, po zastosowaniu tego pierwszego nie powstaje uretan 38. Mimo użycia chloromrówczanu etylu do syntezy ponad dwustu fosfonopeptydów nigdy nie obserwowałem tworzenia uretanów. Zastosowanie obok chloromrówczanu hydroksybenzotriazol (HOBT), polecanego ostatnio jako dodatek w tej reakcji [62], nie tylko nie przyniosło żadnych korzyści, ale powodowało wyraźne zmniejszenie wydajności reakcji. Spośród pięciu użytych amin najlepsze wyniki uzyskuje się po zastosowaniu trietyloaminy i N-metylomorfoliny, podczas gdy pozostałe powodują znaczne zmniejszenie wydajności reakcji (tab. 6).

Na podstawie tych wyników opracowałem procedurę, w której N-chromione aminokwasy przeprowadza się w mieszane bezwodniki w reakcji z chloromrówczanem etylu w chloroformie zawierającym trietyloaminę. Chloroform

został wybrany dlatego, że ważnym etapem w syntezie fosfonopeptydów jest ekstrakcja mieszaniny reakcyjnej wodnymi roztworami kwasów i zasad. Jest to podstawowy sposób oczyszczania produktu reakcji i zastosowanie chloroformu pozwala uniknąć dodatkowej operacji, jaką jest - na przykład w przypadku tetrahydrofuranu - usuwanie rozpuszczalnika, a następnie rozpuszczenie otrzymanej mieszaniny w innym rozpuszczalniku nie mieszającym się z wodą (np. octanie etylu lub chloroformie). Wybór chloromrówczanu etylu i trietyloaminy podyktowany został niskimi cenami obu tych reagentów w porównaniu z chloromrówczanem izobutyłu i N-metylomorfoliną.

Badałem też wpływ czasu tworzenia bezwodnika na wydajność fosfono-peptydu 42. Stwierdziłem, że optymalny przebieg reakcji otrzymuje się utrzymując reagenty (N-chroniony aminokwas, trietyloamina i chloromrówczan etylu) w chloroformie przez pół godziny w temperaturze od -5 do 0 °C (rys. 1).

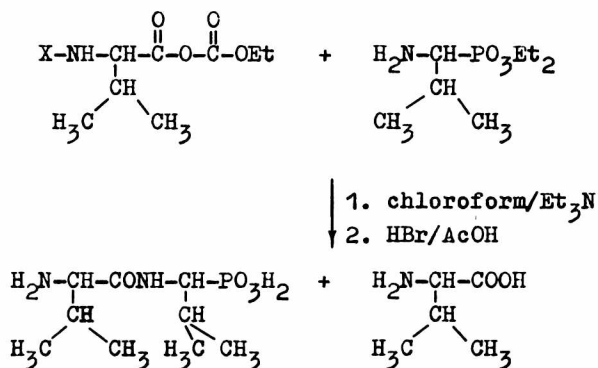


Rys. 1. Wpływ czasu tworzenia mieszanego bezwodnika na wydajność 1-(N-karbobenzoksyl-L-leucyloamino)-2-(4-metoksyfenyl)etanofosfonianu dietylowego

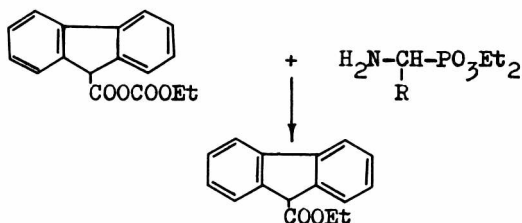
Fig. 1. The influence of the time of formation of the mixed anhydride on the yield of diethyl 1-(N-benzyloxycarbonyl-L-leucylamino)-2-(4-methoxyphenyl)ethylphosphonate

Wydajności reakcji często były jednak niskie i dlatego zastosowałem ogrzewanie mieszaniny bezwodnika i aminoestru. Rzeczywiście, nastąpił wzrost wydajności, niekiedy dość znaczny (tab. 7). Ogrzewanie mieszaniny

bezwodnika i estru jest rzadko stosowane ze względu na to, że w tych warunkach wzrasta prawdopodobieństwo powstawania estrów 39. W większości syntez nie obserwowałem jednak przebiegu tej reakcji ubocznej. Do nielicznych wyjątków należą reakcje, w których substratami są N-chroniona walina i aminofosfoniany zawierające zawadę przestrzenną. Otrzymywałem wtedy mieszaninę pożądanego peptydu 16 i walinę, produkt hydrolizy estru 39, np.:



Przypadkiem krańcowym było acylowanie aminofosfonianów kwasem fluoreno-9-karboksylowym za pomocą metody mieszanych bezwodników; w wyniku podgrzania mieszaniny reakcyjnej otrzymano wówczas tylko odpowiedni ester etylowy tego kwasu:



Aby uniknąć powstawania estrów 39 należy zrezygnować z etapu ogrzewania. Oczywiście, odbija się to na wydajności reakcji.

3.1.2. Ogólny przepis na otrzymywanie fosfopeptydów metodą mieszanych bezwodników

Ostateczna wersja procedury otrzymywania fosfopeptydów polega na tym, że w chloroformie zawierającym trietyloaminę rozpuszcza się N-chroniony aminokwas tak, aby stosunek molowy aminokwasu i trietyloaminy wynosił 1:1. Po ochłodzeniu do $-5-0^{\circ}\text{C}$ dodaje się równomolową ilość chlornórczanu etylu i mieszaninę utrzymuje w tej temperaturze przez pół

godziny. Następnie dodaje się chloroformowy roztwór estru dialkylowego kwasu aminofosfonowego (może on być otrzymany przez rozpuszczenie halogenowodoru lub wodoroszczawianu tego estru w chloroformie zawierającym trietyloaminę) i roztwór miesza się do osiągnięcia temperatury pokojowej, następnie ogrzewa do wrzenia i po ochłodzeniu ekstrahuje kolejno: wodą, roztworem kwasu solnego, wodą, nasyconym roztworem kwaśnego węgla, wodą i solanką. Po osuszeniu z warstwy organicznej usuwa się składniki lotne, a otrzymany gęsty olej rozpuszcza w roztworze bromowodoru (30-45%) w lodowatym kwasie octowym i zostawia na 12 godzin w temperaturze pokojowej. Po usunięciu lotnych składników na wyparce obrotowej otrzymany olej miesza się z wodą, usuwa powstały bromek benzylu przez ekstrakcję eterem dietylowym i odparowuje wodę pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany oleisty produkt rozpuszcza się w etanolu i peptyd 16 wytrąca, dodając tlenek propylenu lub pirydynę. Produkty krystalizuje się z mieszanin woda-etanol lub woda-aceton.

Metoda mieszanych bezwodników daje zazwyczaj równomolowe mieszaniny diastereomerów, co można obserwować zarówno w widmach ^{31}P oraz $^1\text{H-NMR}$ całkowicie chronionych produktów 36 reakcji, jak i odblokowanych fosfopeptydów 16 [63], [64]. Jest to ważne, gdyż do badań biologicznych potrzebne są związki o zdefiniowanej czystości optycznej.

Za pomocą opisanej metody otrzymaliśmy znaczną liczbę fosfopeptydów (tab. 7 i 8), a opracowana procedura została zaprezentowana w kilku pracach [64]-[68].

Otrzymane peptydy zostały użyte do badań biologicznych. Zbadaliśmy wpływ 32 peptydów, zawierających alaninę i leucynę na N-końcu łańcucha i 16 kwasów aminofosfonowych na P-końcu, na wzrost sześciu szczepów bakteryjnych. Stwierdziliśmy, że te, które zawierają fosfonowe analogi kwasu glutaminowego i α -metyloalaniny, są interesującymi, potencjalnymi środkami antybakteryjnymi [64]. Bardziej szczegółowe badania mikrobiologiczne są w toku.



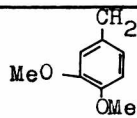
Zbadaliśmy także wpływ około 100 peptydów 16 na wzrost roślin. Wyniki tych badań pozwoliły sformułować hipotezę, że podobnie jak antybakteryjne fosfopeptydy [68], [69], peptydy te są transportowane w tkankach roślinnych przez błony komórkowe, a dopiero uwolnienie toksycznego aminofosfonianu w komórce powoduje zakłócenie wzrostu rośliny.

Oddzielnym problemem była synteza fosfopeptydów zawierających P-terminalne fosfonowe analogi morfaktyn i dlatego zostanie ona omówiona w następnym punkcie.


Tabela 7

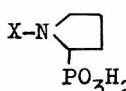
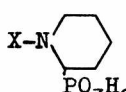
Fosfonopeptydy $\text{X-NH-C} \begin{matrix} \text{R}^1 \\ | \\ \text{PO}_3\text{H}_2 \\ | \\ \text{R}^2 \end{matrix}$ otrzymane metodą mieszanych bezwodników

X	R ¹	R ²	Wyd. (%) Metoda ^a	Temp. top. rozkł. (°C)	[α] ₅₇₈ ²⁰ (c 1, H ₂ O) (°)
1	2	3	4	5	6
Ala	H	H	28/A	279-84	+30
DL-Val			61/A	233-36	-
Leu			43,5/B	198-99	+46
Gln			12,5 B	198-99	+25
Gly	H	Me	61/B	247-50	-
Ala			61/B	278-86	+12
			61/C		
			56/E		
DL-Ala			61,5/A	290-91	-
Val			72,5/B	251-57	+38
Leu			59/B	245-51	+30
			66/D		
			56/G		
Pro			28/A	277-82	-45
			40,5/B		
Met			46/B	208-13	+23
Phe			29,5/A	238-40	+34
β-Ala			56/A	264-66	-
GlyGly			22/A	b	-
Gly	H	Et	8/A	269-72	-
			66/B		
			52/E		
Ala			48/A	272-80	+18
			81/B		
DL-Ala			76,5/B	269-71	-
Leu			38/A	254-56	+25
DL-Phe			38/A	253-54	-
Val			80/B	255-61	+37
			58/E		
GlyGly			33,5/A	b	-
β-Ala	H	Pr ⁿ	32/A	235-39	-

1	2	3	4	5	6
Ala	H	Pr ⁱ	59/B	262-64	+12
Val			52/C		
Leu			58/A	254-57	+32
Phe			59/E		
β-Ala			69/B	260-63	+26
Lys			60/B		
			45/D	261-65	+55 ^c
			56/A		
			38/B	220-25	+6
Ala	H	Bu ⁱ	47/C	261-64	+18
Val			82/B		
Leu			80/B	266-68	+28
			50/C		
Gly	H	Ph	75/B	269-70	-
Ala			54/E		
DL-Val			56/A	258-60	-
Val			52/A		
Leu			63/A	266-67	+1 ^d
Phe			58/A		
Pro			63/A	279-81	-53
Lys			75/A		
					265-68
Ala	H		52/C	285-87	+11 ^d
Val			28,5/C		
Lys			74/C	250-60	+7 ^e
Thr (OAc)			5/C		
GlyGly				33,5/C	270-72
				217-21	-
Ala	H		48/C	289-92	+3
Leu			16/C		
Ala	H		59/C	288-89	+27
Val			33/C		
Leu			56/C	248-53	+10
Lys			62/C		
Thr (OAc)			40/C	265-66	+37
GlyGly			33,5/C		
				semi-solid	+12
				semi-solid	-5
				236-37	-

cd. tab. 7

1	2	3	4	5	6
Ala Leu	H	Bu ^t	21/C 23/C	215-16 263-64	+12 +23
Ala Leu	H	Pr ^c	44/C 44/C	270-74 258-60	+20 +34
Ala Leu	H	Bu ^c	66/C 20/C	280-84 263-65	+24 +33
Gly Ala Leu	H	Pen ^c	25/C 55/C 55/C	263-65 245-51 265-67	- +15 +25
Ala Leu	H	Hex ^c	61/C 38/C	278-80 267-69	+11 +7,5 ^g
Ala Leu	H	Ada	30,5/C 62/C	276-79 261-63	+12 ^g +62 ^d
Ala	H	$(\text{CH}_2)_2$ PO ₃ H ₂	30/C	195-90	+13
Ala Val Leu Pro Met	H	$(\text{CH}_2)_2$ COOH	47/C 41/C 61/C 45/C 27/C	230-34 249-53 223-24 222-24 164-65	+15 +31 +28 -29 +29
Ala Val Leu Pro	H	$(\text{CH}_2)_3$ COOH	23/C 39/C 33/C 39/C	233-34 247-52 190-94 245-49	+13 +49 +22 -44
Ala	H	$(\text{CH}_2)_4$ COOH	61/C	236-38	+14
Val Leu	H		70/B 67/B	297-310 293-302	+7 +8,5
Gly DL-Ala Ala Val DL-Leu	Me	Me	10/A 38/A 81/B 81/B 26/A 71,5/B 29,5/A 71,5/B	246-48 259-62 238-40 236-38 251-54	- - +73 +91 -

1	2	3	4	5	6
Leu	Me	Me	32/A 71,5/B	248-53	+82
Phe			21/A 33/B	246-49	+113
Pro			68/B	241-42	-11
Lys			36/B	225-57	+9
Met			35/A	198-200	+14
Gly	Me	Et	49/B	236-38	-
DL-Ala			33,5/A 62,5/B	229-31	-
DL-Val			59,5/B	229-31	-
Val			48/A 80/B	236-39	+52
DL-Leu			36/A	205-12	-
Leu			29/A	236-37	+36
Phe			41/B	198-202	+28
Gly	Me	Pr ⁱ	42/B	299-302	-
DL-Ala			33,5/A	218-22	-
DL-Val			79/B	213-17	-
Val			31/A	213-19	+51
Phe			64/B	226-29	-6
Ala	-(CH ₂) ₅ -		7/B	246-47	+47
Val			56/B	249-50	+85
Leu			55/B	245-47	+51
Pro			58/B	242-46	+3
Met			43/B	243-46	+50
GlyGly			46/C	242-43	-
Ala			35/B	200-202	+14
Leu			31/B	239-41	+25
Ala			15/B	237-40	+88
Leu			30/B	266-68	+27

1	2	3	4	5	6
Gly			65,5/B	247-48	-
Phe	X-NH-CH ₂ CH ₂ CH ₂ PO ₃ H ₂		93/B	279-81	+54
Leu			68/B	258-59	+19

Skróty: Me - metyl; Et - etyl; Prⁿ - n-propyl; Prⁱ - izopropyl; Pr^c -
- cyklopropyl; Buⁱ - izobutyl; Bu^t - tert-butyl; Bu^c - cyklobu-
tyl; Pen^c - cyklopentyl; Hex^c - cykloheksyl; Ada - adamantyl;
Ph - fenyl; Ac - acyl

- ^a A - substraty: Z-aminokwas, ester dietylowy, bez ogrzewania;
B - substraty: Z-aminokwas, ester dietylowy, z ogrzewaniem;
C - jak w B, tylko że estru użyto w formie szczawianu;
D - substraty: N-formyloaminokwas, ester dietylowy, z ogrzewaniem;
E - substraty: ftaliloaminokwas, ester dietylowy, bez ogrzewania,

^b rozkład przed topnieniem,

^c (c 2, 1M NaOH),

^d (c 1, 1M NaOH),

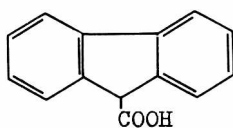
^e nierozpuszczalny w wodzie, rozkłada się w kwasie i zasadzie,

^f (c 0,67; 1,67M HCl),

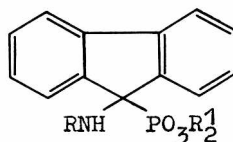
^g (c 0,8; 0,4M NaOH).

3.1.3. Fosfonopeptydy zawierające P-terminalne fosfonowe analogi morfaktyn

Pochodne kwasu fluoreno-9-karboksylowego 43 są interesującymi fito-
hormonami i regulatorami wzrostu roślin [70]. Zaprojektowane na zasa-
dzie analogii do tego kwasu fosfoniany 44 [71],[72] w różnoraki sposób
wpływają na wzrost roślin, zależnie od ich budowy chemicznej. Najciekaw-
szą grupą są N-alkilofluorenofosfoniany dialkilowe (44: R=R¹=alkil),
które są silnymi herbicydami. Kwas 9-aminofluoren-9-fosfonowy (44: R=
=R¹=H) nie wpływa na wzrost roślin.



43



44

Założyliśmy, że kwas ten, być może, nie jest transportowany w tkankach
roślinnych lub przez błony komórkowe.

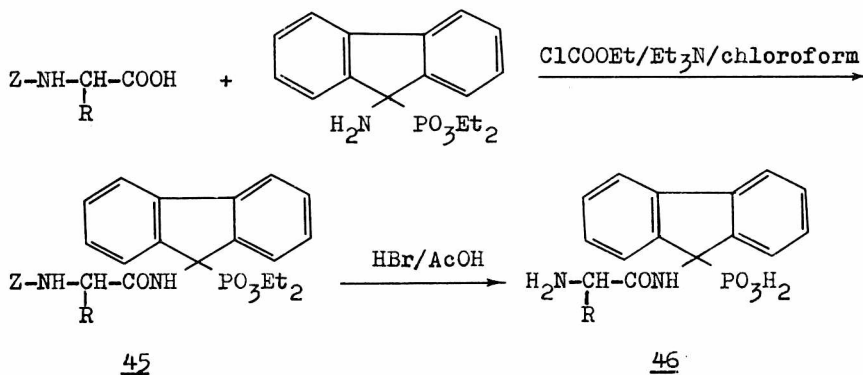
Jedną z metod umożliwiających przenoszenie związków przez błony
biologiczne jest przeprowadzenie ich w pochodne peptydowe [73]-[77].
Zsyntezowaliśmy peptydy kwasu 9-aminofluoren-9-fosfonowego mając nadzie-
ję, że poprawi to aktywność herbicydową. Niespodziewanie synteza tych

Peptydy 49 zawierające P-terminalne kwasy 9-aminofluoreno-9-fosfonowe

R	Wydajność (%)	Temp. top. rozkład (°C)	$[\alpha]_{578}^{20}$ (c 1, H ₂ O)
Me (Ala)	20	186-188	+3
Pr ⁱ (Val)	2	276-278	+25
Bu ⁱ (Leu)	26	260-262	+33
Bz (Phe)	20,5	235-237	+7 ^a
(Pro)	60	275-278	-31
(CH ₂) ₄ NH ₂ (Lys)	80	256-258	+67
(CH ₂) ₂ (Gln) CONH ₂	39	227-229	+35
CH-CH ₃ (Thr) OH	39	258-261	+10
(CH ₂) ₂ SMe (Met)	70	231-233	+60
(GlyGly)	49	249-252	-

^a (c 1, 1M NaOH)

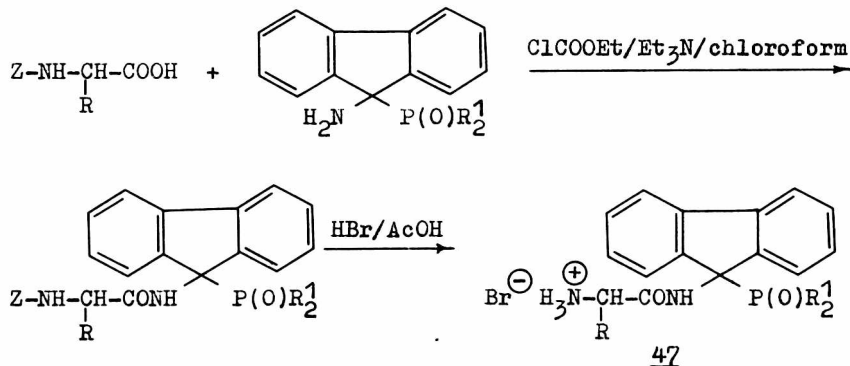
peptydów nastąpiła wiele trudności. Wiązanie peptydowe tworzy się łatwo według standardowej procedury opisanej w poprzednim punkcie, ale otrzymane peptydy 45 są stosunkowo nietrwałe i rozpadają się zarówno w warunkach kwaśnych, jak i zasadowych, dając różne pochodne fluorenoimi-ny. W rezultacie, zależnie od struktury chemicznej reszty N-końcowej, otrzymywałem peptydy 46 z wydajnościami od 2 do 80% (tab. 8).



Peptydy te są nową klasą interesujących regulatorów wzrostu roślin. W stężeniach od 5 do 500 μM powodują one wydłużenie korzeni roślin z jednoczesnym skróceniem ich łodyg.

Ponieważ 9-aminofluoreno-9-fosfinotlenki dialkylowe są silnymi herbicydami [78], postanowiłem zsyntezować ich peptydy 47 i porównać aktywność herbicydową tych połączeń z aktywnością odpowiednich estrów dialkylowych 48. Synteza peptydów 47 nie następuje z trudnością, a produkty otrzymuje się z dobrymi wydajnościami (tab. 9).

Peptydy fosfinotlenków to grupa nowych interesujących herbicydów, rzadki przypadek biologicznie czynnych fosfinotlenków.



T a b e l a 9

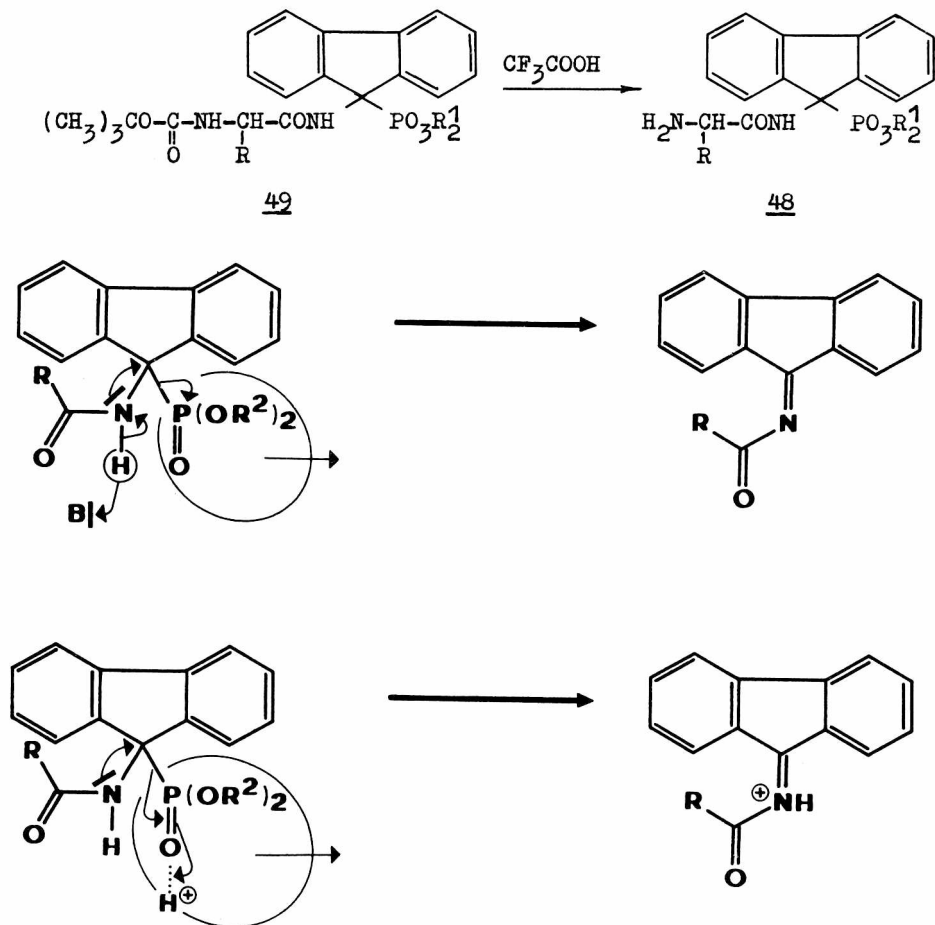
Peptydy 47 zawierające P-terminalne 9-aminofluoreno-9-fosfinotlenki dialkylowe

R	R ¹	Wydajność (%)	Temperatura topnienia (°C)	[α] ₅₇₈ ²⁰ (c 1, H ₂ O)
Me (Ala)	Bu ⁿ	61	olej	+12,5
(CH ₂) ₄ NH ₂ (Lys)	Bu ⁿ	47,5	olej	+36
CH(OH)CH ₃ (Thr)	Bu ⁿ	60	153-156	-7 ^a
(GlyGly)	Bu ⁿ	56	174-176	-
Me (Ala)	Am ⁿ	63	olej	+1,2 ^b
(Pro)	Am ⁿ	67	olej	-15 ^b
(GlyGly)	Am ⁿ	47	olej	-
(CH ₂) ₄ NH ₂ (Lys)	Am ⁱ	62	173-175	+31
(GlyGly)	Am ⁱ	61	177-178	-

^a (c 1, CH₃OH),

^b (c 2,5, CH₃OH).

W celu otrzymania peptydów 48 trzeba było zastosować metodę, która umożliwiłaby usunięcie grupy chroniącej funkcję aminową bez naruszenia fosfonianowych wiązań estrowych. Wybrałem tu grupę t-butoksykarbonylową, którą łatwo usuwa się w kwasie trifluoroctowym.



Rys. 2. Rozpad fosfonopeptydu 49 w warunkach: A - zasadowych, B - kwaśnych
 Fig. 2. The decomposition of the phosphonopeptide 49 in: A - basic, B - acidic conditions

Metodą tą udało mi się otrzymać jedynie dwa peptydy, gdyż podczas standardowego oczyszczania produktów i usuwania osłony t-butoksykarbonylowej otrzymane peptydy rozpadały się, przechodząc w mieszaniny produktów zerwania wiązania fosfor-węgiel. Można to wytłumaczyć za pomocą mechanizmów reakcji przedstawionych na rys. 2.

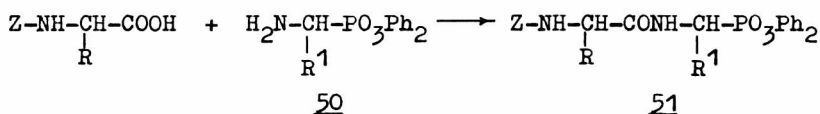
Syntezy związków opisanych w tym paragrafie oraz wstępne badania ich wpływu na wzrost roślin opisane zostały w trzech publikacjach [67], [79], [81].

Z badań opisanych w rozdz. 3 wynika, że estry dialkylowe kwasów aminofosfonowych są dużo lepszymi substratami w syntezie fosfonopepty-

dów niż wolne kwasy aminofosfonowe. Spośród stosowanych przeze mnie metod tworzenia wiązania peptydowego najzużyteczniejsza jest metoda mieszanych bezwodników.

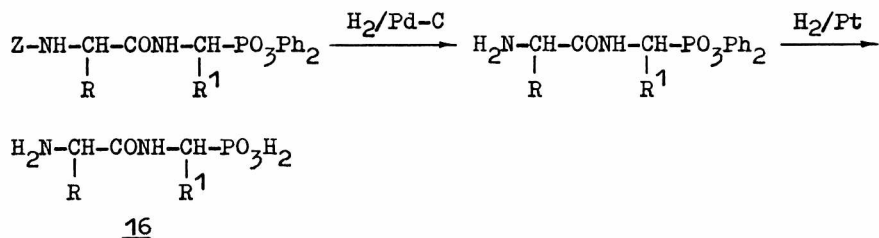
4. ESTRY DIFENYLOWE KWASÓW AMINOALKANOFOSFONOWYCH W SYNTEZIE FOSFONOPEPTYDÓW

W roku 1979 Oleksyszyn i współpracownicy [82] opisali prostą i dogodną metodę syntezy nowej grupy związków - estrów difenylowych kwasów aminoalkanofosfonowych. Otrzymuje się je w reakcji amidoalkilowania fosforynu trifenylowego aldehydami i karbaminianem benzylu, a następnie po acidolitycznym usunięciu osłony grupy aminowej. Estry te zainteresowały mnie jako łatwo dostępne substraty w syntezie fosfonopeptydów. Próby syntezy tych peptydów polegały na sprzęganiu aminofosfonianów difenylowych 50 z karbobenzoksyaminokwasami metodą mieszanych bezwodników. Równolegle Oleksyszyn stosował w tym celu metodę DCC [65],[83]. Obydwie metody dają pożądane peptydy 51 z dobrymi wydajnościami.

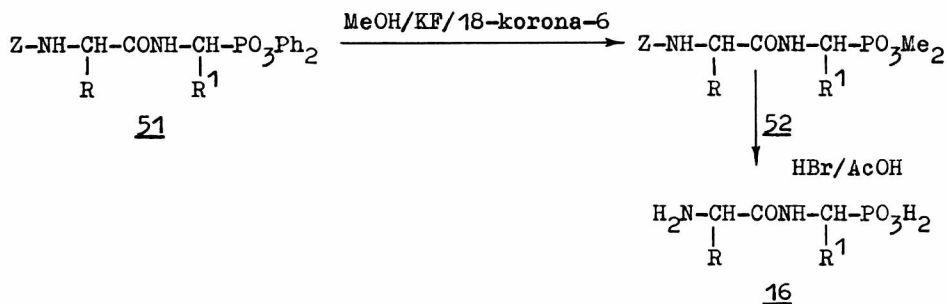


Na podstawie badań produktów reakcji za pomocą $^{31}\text{P-NMR}$ stwierdzono, że zachodzi różnica, gdy reakcję prowadzi się metodą mieszanych bezwodników lub DCC. Po zastosowaniu pierwszej metody otrzymywano równomolowe mieszaniny diastereomerów, podczas gdy w wyniku metody DCC uzyskiwano niewielki nadmiar izomeru L-D (S-S) w mieszaninie reakcyjnej (obserwuje się tu kinetyczną kontrolę reakcji).

Podstawową trudnością, która pojawiła się przy użyciu aminofosfonianów difenylowych w syntezie fosfonopeptydów, było znalezienie metody usuwania reszt fenylowych z grupy fosfonowej. Najprostszym sposobem wydawało się hydrolityczne usunięcie obu grup: benzyloksykarbonylowej, chroniącej funkcję aminową, i fenylowych, chroniących grupę fosfonową. Użycie katalizatora palladowego powodowało tylko usunięcie osłony grupy aminowej, dopiero zaś po zastosowaniu katalizatora Adamsa uzyskano pożądany wynik. Taka dwustopniowa procedura jest jednak dość skomplikowana i kosztowna.



Innym sposobem jest przeprowadzenie estrów difenylowych w estry dialkilowe, a następnie zastosowanie standardowej acidolizy. Najprostszym sposobem transestryfikacji jest rozpuszczenie peptydu 51 w alkoholowym roztworze odpowiedniego alkoholanu sodu. Obawiałem się jednak, że tak drastyczne warunki reakcji sprzyjać będą racemizacji optycznie czynnych składników peptydu. Z literatury znana była metoda konwersji fosforanu trifenylowego w trialkilowe [84], [85] za pomocą alkoholowych roztworów fluorku cezu. Zastosowanie modyfikacji tej metody, polegającej na użyciu w miejsce fluorku cezu fluorku potasu i katalitycznych ilości eteru koronowego, w syntezie fosfopeptydów dało bardzo dobre rezultaty. Otrzymane w ten sposób estry dimetylowe 52 były przeprowadzane w standardowy sposób w peptydy 16 (tab. 10).

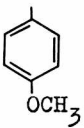
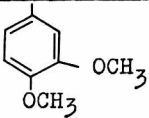


Wyniki badań opisane w tym rozdziale zostały przedstawione w publikacjach [64], [86]–[88].

Metoda syntezy fosfopeptydów, w której jako substratów używa się estrów difenylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych, znacznie rozszerza możliwości modyfikacji strukturalnych P-końcowego fragmentu tych peptydów.

T a b e l a 10

Fosfonopeptydy 16 otrzymane z estrów difenylowych kwasów aminofosfonowych

R	R ¹	Metoda	Wydajność (%)	T. top., rozkł. (°C)	$[\alpha]_{578}^{20}$ (c 1, H ₂ O)
Me (Ala) Bu ⁱ (Leu)	Me	A B	59 50	178-286 245-251	+12 +30
Me (Ala) Pr ⁱ (Val) Bu ⁱ (Leu) (Pro)	Pr ⁱ	B B B B	59 53 48 46	262-264 254-257 260-263 267-270	+12 +32 +26 -36
Me (Ala) Pr ⁱ (Val) Bu ⁱ (Leu) (Pro)	Bu ⁱ	B B B C	63 75 69 50	261-264 262-266 266-268 186-191	+18 +30 +28 -38
Me (Ala) Pr ⁱ (Val) Bu ⁱ (Leu) CHOAc (Thr) CH ₃ OAc (GlyGly)		B B B B B	41 53 52 45 13	265-268 273-278 247-249 151-155 268-272	+11 ^b +2 ^c +3 ^b -63 -
Me (Ala) Bu ⁱ (Leu)		B B	51 63	273-275 233-235	-6 ^b +6
Me (Ala) Pr ⁱ (Val) Bu ⁱ (Leu) (Pro) (CH ₂) ₄ NH ₂ (Lys) CH(OH)CH ₃ (Thr) (GlyGly)	CH ₂ Ph	B B B B B B B	75 56 32 45 52,5 8 29	260-264 265-268 268-271 256-258 256-258 196-199 264-266	+4 ^b -2 ^c +8 ^b - +25 -19 -
Me (Ala) Pr ⁱ (Val) Bu ⁱ (Leu) (Pro)	CH ₂ OAc	B B B B	39 17 35 42	186-189 209-210 240-243 240-247	+9 +27 +21 -43
Bu ⁱ (Leu) (Pro)	CH ₂ OH	D D	80 75	250-253 267-268	+30 -98

Oznaczenia do tab. 10:

- ^a A - hydrolityczne usuwanie osłon; B - transestryfikacja MeOH/KF/eter koronowy; C - transestryfikacja CsF/MeOH; D - z O-acetylopeptydów przez hydrolizę na Dowexie 50W X8,
^b (c 1; 1M NaOH),
^c (c 1,5; 5M HCl).

5. OTRZYMYWANIE DIASTEREOMERYCZNYCH FOSFONODIPEPTYDÓW

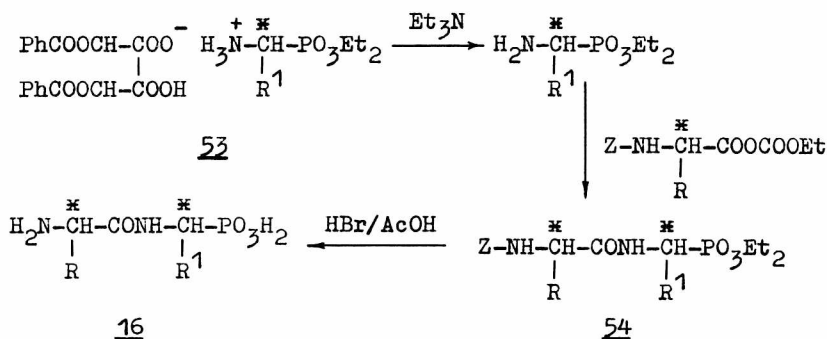
Fosfonopeptydy wykazują różnorodną aktywność biologiczną [35]. Wiele z nich to interesujące regulatory wzrostu roślin, niektóre są obiecującymi środkami antybakteryjnymi, inne zaś to neuromodulatory. W większości opisanych badań biologicznych używano mieszanin diastereomerów tych peptydów, co znacznie ogranicza możliwości wyciągnięcia wniosków dotyczących zależności między ich budową a obserwowanymi efektami biologicznymi i tym samym utrudnia planowanie syntez nowych aktywnych związków. Do bardziej wnikliwych badań biologicznych niezbędne były czyste stereoisomery fosfonopeptydów. Podjąłem zatem próby opracowania metody otrzymywania takich izomerów.

Większość danych dotyczących otrzymywania stereoisomerycznych fosfonodipeptydów można znaleźć w literaturze patentowej lub streszczeniach komunikatów konferencyjnych. Opisane metody polegają głównie na rozdzielaniu mieszanin diastereomerów przez krystalizację po uprzednim dodatkowym przeprowadzeniu ich w sole z różnymi optycznie aktywnymi aminami [89]–[94]. Znacznie mniej uwagi poświęcono innym sposobom, takim jak rozdział diastereomerów całkowicie chronionych peptydów za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym [95], [96] czy też frakcjonowana krystalizacja odblokowanych peptydów 16 z mieszaniny woda-eta-nol [83], [94], [97].

Najprostszym sposobem otrzymywania diastereomerycznych fosfonodipeptydów wydawało się użycie optycznie aktywnych estrów kwasów aminoalkanofosfonowych. Jednakże większość metod otrzymywania tych estrów opisana w literaturze (bardzo wyczerpującą pracę przeglądową na temat otrzymywania optycznie czynnych kwasów aminofosfonowych i ich estrów opublikowali ostatnio Dhawan i Redmore [98]) to syntezy asymetryczne, złożone z dość skomplikowanych i wieloetapowych procedur. Jedyną bardziej ogólną metodą jest opracowany przez Bielewica [99], [100] oraz Kowalika [101]–[103] rozdział estrów dietylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych za pomocą kwasu winowego lub dibenzoilowinowego. W pierwszym etapie badań moje zainteresowania skoncentrowały się właśnie na użyciu optycznie czynnych estrów dialkilowych w syntezie fosfonopeptydów.

5.1. Zastosowanie optycznie aktywnych estrów dietylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych w syntezie diastereomerycznych fosfopeptydów

Dibenzoilowiniany optycznie aktywnych 1-aminoalkanofosfonianów dietylowych, otrzymywane w wyniku rozdzielania racemicznych estrów optycznie czynnymi kwasami dibenzoilowinowymi, mogą być użyte bezpośrednio w syntezie fosfopeptydów. Kwas dibenzoilowinowy nie wpływa bowiem ani na przebieg, ani na wydajność reakcji tworzenia wiązania peptydowego. Estrы dietylowe optycznie aktywnych kwasów aminofosfonowych uwalniane z tych soli (53) za pomocą trietyloaminy, sprzężeniem z benzyloksykarbonylo-L-aminokwasami i po standardowej przeróbce otrzymywałem diastereomeryczne peptydy 16 (tab. 11).



Czystość otrzymywanych peptydów, kontrolowana metodą chromatografii cienkowarstwowej i pomiarem skręcalności właściwej, była zależna od szarży użytej w syntezie soli otrzymanej z rozdzielania. Można było zatem wnioskować, że metoda rozdzielania estrów dietylowych kwasów aminofosfonowych na enancjomery za pomocą kwasu dibenzoilowinowego nie była dopracowana. Ponieważ diastereomeryczne sole 53 zwykle nie dawały dwóch sygnałów w widmach $^{31}\text{P-NMR}$, na podstawie zaś ich widm $^1\text{H-NMR}$ nie można było ocenić ich czystości, reakcja tworzenia peptydów posłużyła jako metoda oceniania czystości otrzymanych enancjomerycznych estrów. I tak, surową mieszaninę po reakcji tworzenia wiązania peptydowego analizowano za pomocą $^{31}\text{P-NMR}$, obserwując dwa sygnały odpowiadające diastereomerycznym peptydom 54. Stwierdzono jednak, że rozdzielanie racemicznych 1-aminoalkanofosfonianów dietylowych za pomocą optycznie czynnych kwasów dibenzoilowinowych w wielu przypadkach nie daje czystych enancjomerów tych estrów mimo wielokrotnego krystalizowania ich soli 53. Jest to niewątpliwym ograniczeniem tej prostej i atrakcyjnej metody.

Wyniki badań opisanych w tym paragrafie zostały przedstawione na V Ogólnopolskiej Konferencji Chemii Aminokwasów i Peptydów w Łodzi [104].

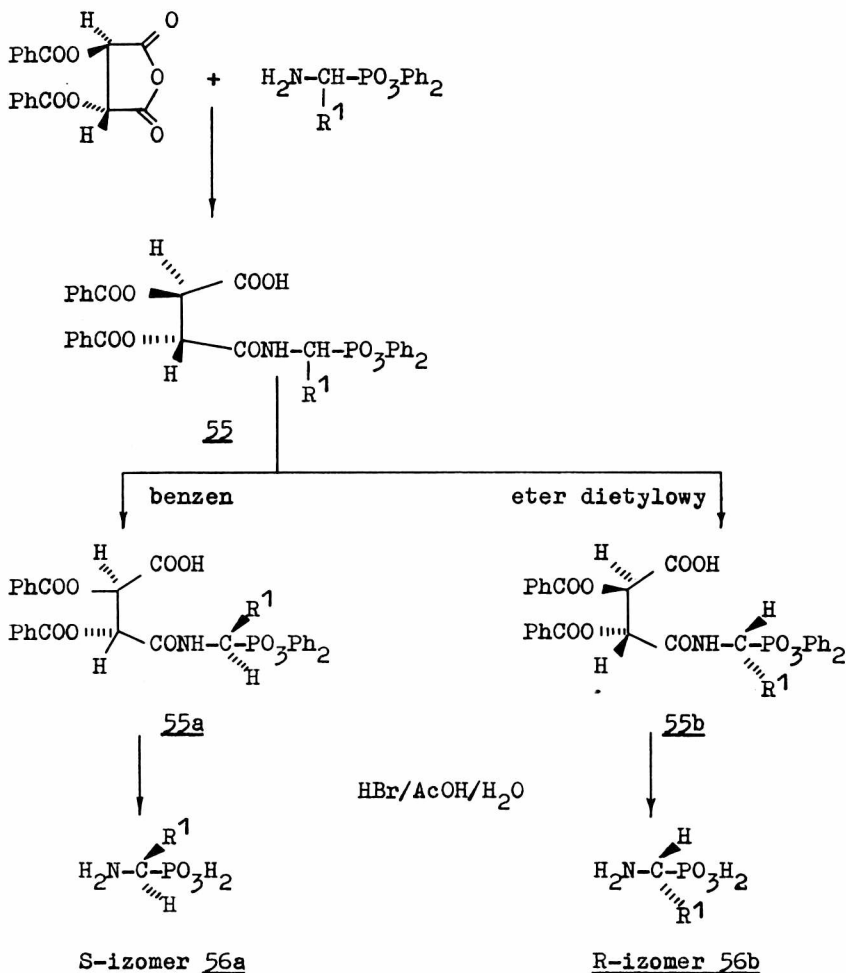
Diastereomeryczne fosfono-peptydy 16 otrzymane z dibenzoilowinianów 52

R	R ¹	Konfiguracja amino- fosfonianu	Wydajność (%)	[α] ₅₇₈ ²⁰ (c 1, H ₂ O) (°)	lit. [α] ₅₇₈ ²⁰ (c 1, H ₂ O) (°)
H (Gly)	Me	S	27,5	+36	+70 [89]
Me (Ala)		S	81	+74	+84 [89]
		R	51	-50	+75 [65]
					-45 [89]
					-49 [65]
Me (DL-Ala)		S	71,5	+9	
Pr ⁱ (Val)		S	62	+82	+84 [65]
Bu ⁱ (Leu)		S	46,5	+72	+73 [65]
		R	69	-11	-14 [89]
					-13 [65]
Bz (Phe)		S	66,5	+88	
(Pro)		S	61	-12	
		R	36,5	-87	
(GlyGly)		S	31,5	+21	
Me (Ala)	Et	S	81	+56	+75 [65]
Pr ⁱ (Val)		S	59	+73	
Bu ⁱ (Leu)		S	53	+56	+83 [65]
(CH ₂) ₂ Me (Met)		S	57,5	+84	

5.2. Próby otrzymania enancjomerów 1-aminoalkanofosfonianów difenylowych

Możliwość zastosowania łatwo dostępnych aminofosfonianów difenylowych w syntezie fosfono-peptydów stała się zachętą do podjęcia prób otrzymania tych estrów w formie optycznie aktywnej. Ponieważ nie powiodły się próby rozdziału soli tych estrów z optycznie czynnymi kwasami, postanowiliśmy rozdzielać diastereomery, w których czynnik chiralny związany jest z grupą aminową fosfonianu wiązaniem kowalencyjnym. Wybór padł na łatwo dostępny bezwodnik dibenzoil-L-winowy, który został zastosowany przez Kolasę i Chimiaka [105] do rozdziału DL-O-(tetrahydro-pyranilo)hydroksyloaminy. Reakcja tego bezwodnika z aminoalkanofosfonianami difenylowymi biegnie gładko, dając odpowiednie amidy 55. Amidy te można łatwo rozdzielić przez krystalizację. Już po jednokrotnej krystalizacji z benzenu lub toluenu otrzymuje się amid 55a zawierający amino-fosfonian o konfiguracji S, a na podstawie widma ³¹P-NMR tego związku można stwierdzić, że zawiera on nie więcej niż 10% drugiego stereoizo-

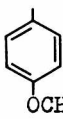
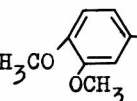
meru. W wyniku rekrystalizacji produktu z benzenu lub toluenu powstaje czysty stereoisomer 55a. Drugi izomer 55b, zawierający R-aminofosfonian, otrzymuje się po odparowaniu benzenu z roztworu po krystalizacji 55a i kilkakrotnej rekrystalizacji z eteru dietylowego.



Stereomeryczne amidy 55a i 55b różnią się znacznie właściwościami fizykochemicznymi. Różnice te zestawiono w tab. 12.

Amidy 55a mają zwykle znacznie wyższą temperaturę topnienia niż amidy 55b. Obserwuje się także znaczne różnice w widmach w podczerwieni. Wartości częstotliwości ν_{NH} obserwowane dla amidów 55a zdają się potwierdzać istnienie silnych wiązań wodorowych, gdy te znajdują się dla amidów 55b są typowe. Co więcej, w widmach amidów 55a obserwuje się dwa pasma odpowiadające drganiom rozciągającym grupy $\text{P}=\text{O}$, a w amidach 55b jedno pasmo.

Wybrane właściwości fizykochemiczne amidów 55a i 55b

R	Konfiguracja aminofosfonianu	Temp. top. (°C)	³¹ P-NMR ^a δ(ppm)	IR		¹ H-NMR sygnał COOCH ₃ δ(ppm)	
				ν _{P=O} (cm ⁻¹)	ν _{NH} (cm ⁻¹)	δ(ppm)	
						w CDCl ₃	w DMSO
Me	S	176,5-177	14,63	1265 1235	3340	5,7-6,2(m)	6,11(s)
	R	81-83	14,45	1250	3250	5,92(s)	5,99(d)
Pr ⁱ	S	186-186,5	18,01	1270 1240	3320	n.r. ^b	5,98(s)
	R	82-85	17,97	1245	3270	n.r.	5,88(d)
Bu ⁱ	S	181-182	18,69	1270 1240	3360	n.r.	6,05(s)
	R	89-91	18,53	1245	3245	5,92(s)	6,03(d)
Ph	S	146-148	13,40	1260 1235	3340	6,45(d)	6,52(s)
	R	96-98	13,09	1250	3245	6,47(d)	6,58(d)
PhCH ₂	S	160-161,5	17,46	1260 1240	3330	n.r.	6,28(s)
	R	79-80	17,27	1240	3240	n.r.	6,22(d)
	S	olej	n.d. ^c	1250 1230	3320	5,82(d)	6,32(d)
	R	163-164	n.d.	1245	3240	5,85(s)	6,33(d)
	S	75-77	n.d.	1260	3340	5,4-6,0(m)	6,30(d)
	R	137-139	n.d.	1250	3260	n.r.	6,35(d)

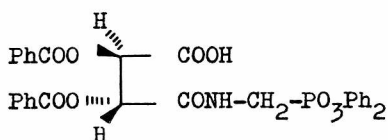
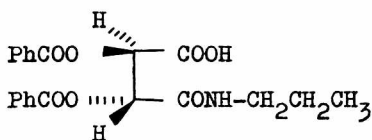
^a (DMSO, 85% H₃PO₄),

^b n.r. - nierozpuszczalny,

^c n.d. - nie wykonano widm ³¹P-NMR.

Również widma ¹H-NMR amidów 55a i 55b różnią się dość znacznie w zakresie odpowiadającym sygnałom grupy CH reszty dibechnzoilowinowej. Dla amidów 55a sygnał tej grupy jest dubletem w widmach wykonanych w chloroformie, a singletem w dimetylosulfotlenku. W odniesieniu do amidów 55b sygnał tej grupy jest singletem w DMSO, a dubletem w chloroformie (tab. 12). Z obserwowanych różnic zdaje się wynikać, że amidy 55a i 55b występują w dwóch różnych formach. Na podstawie szczegółowej analizy danych spektralnych można było założyć, że amidy 55a w niepolarnych rozpuszczalnikach tworzą dimery i krystalizują także w tej formie. W polar-

nych rozpuszczalnikach, takich jak DMSO, dimer ulega rozpadowi. Amidy 55b nie tworzą dimerów, ale krystalizują z eteru w formie eteratów. Hipoteza ta tłumaczy obserwowaną łatwość rozdzielenia diastereomerów i różnice obserwowanych właściwości fizykochemicznych (zwłaszcza zaś istnienie dwóch pasm $\nu_{P=O}$ w widmach IR amidów 55a). Aby potwierdzić to założenie, zsyntezowaliśmy amidy 57 i 58. Zgodnie z oczekiwaniami amid 57 ma takie same właściwości jak amidy 55a, amid 58 daje zaś widmo podobne do widm 55b.

5758

Różnice właściwości fizykochemicznych i fakt, że sygnał ^{31}P -NMR amidów 55a leży zawsze przy wyższych wartościach δ niż sygnał 55b, umożliwiły określenie konfiguracji aminofosfonianów w tych amidach.

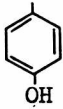
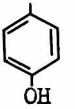
Nie udało się natomiast rozdzielić amidów (55: $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$), otrzymanych z 1-amino-2-acetoksyetanofosfonianu difenylowego. Prawdopodobnie obecność grupy acetylowej (dwa dodatkowe atomy tlenu zdolne tworzyć wiązania wodorowe) nie dopuszcza do utworzenia się dimeru 55a, a różnice między obydwoimi amidami są zbyt małe, aby można rozdzielić je przez krystalizację. Słuszność tego założenia potwierdza też obserwacja, że rozdział amidów otrzymanych z amino(4-metoksyfenyl)metanofosfonianu (55: $\text{R} = 4\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$) i amino(2,4-dimetoksyfenyl)metanofosfonianu (55: $\text{R} = 3,4\text{-(CH}_3\text{O)}_2\text{C}_6\text{H}_3$) difenylowych związków mających dodatkowe atomy tlenu w cząsteczce przebiega znacznie trudniej i wymaga innej kolejności krystalizacji (wpierw krystalizacja 55b z eteru, a następnie wytrącenie 55a heksanem). Co więcej, właściwości fizykochemiczne amidów otrzymanych z obu tych aminofosfonianów nieco odbiegają od pozostałych.

Po hydrolizie diastereomerycznych amidów 55a i 55b mieszaniną kwasu bromowodorowego i octowego otrzymuje się enancjomery kwasów aminofosfonowych (tab. 13).

Za pomocą bezwodnika dibenzoylo-L-winowego nie udało się rozdzielić estrów dietylowych i dimetylowych kwasów aminofosfonowych.

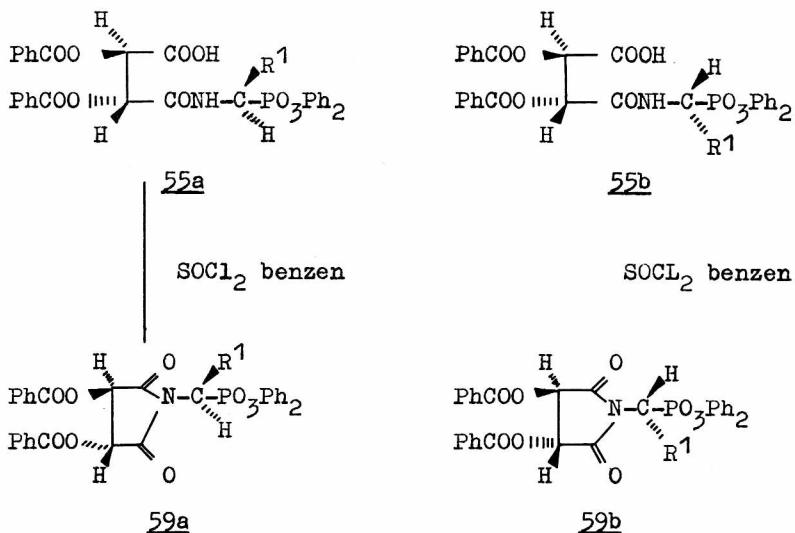
Amidy 55a i 55b łatwo można przeprowadzić w odpowiednie diastereomeryczne imidy 59a i 59b:

Optycznie aktywne kwasy aminofosfonowe 56a i 56b

R ¹	Konfi- gura- cja amino- fosfo- nianu	Temp. top. rozkł. (°C)	[α] ₂₀ ⁵⁷⁸ (c 1, 1M NaOH) (°)	Literaturowe [α] ₂₀ ⁵⁷⁸ (c 1, 1M NaOH) (°)
Me	S	278-279	+17	+16,8 [106]
	R	277-278	-16	-16,9 [106]
Pr ⁱ	S	277-278	-0,6 ^a	-1,0 [107]
	R	272-273	+0,6 ^a	+1,0 [107]
Bu ⁱ	S	278-280	+25	
	R	288-290	-24	
Ph	S	278-279	-20	-19,4 [107], [108]
	R	280-282	+19	+19,4 [107], [108]
PhCH ₂	S	269-270	+52	+49,9 [101]
	R	267-268	-49	-49,9 [101]
	S	282-284	-4 +6 ^b	
	R	281-283	+5 -6 ^b	
 OH	S	282-284	-4 +6 ^b	
	R	282-283	+5 -5 ^b	

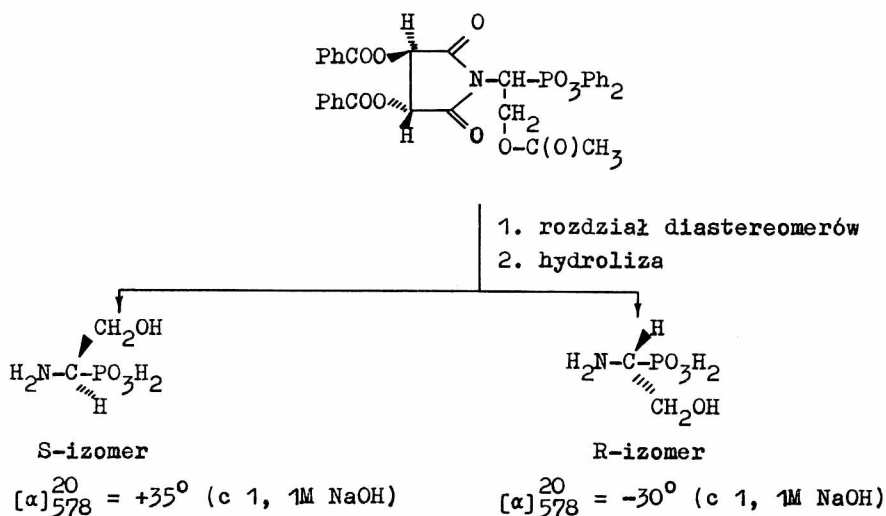
^a (c 5, 1M NaOH),^b (c 1, 1M HCl).

Ponieważ struktura imidów 59 przypomina ftaliloaminokwasy, mieliśmy nadzieję, że fragment dibenzoilowinowy będzie można usunąć, podobnie jak grupę ftalilową, i otrzymać estry difenyłowe kwasów aminofosfonowych. Niestety, imidy 59 rozkładają się w środowisku zasadowym (również w alkoholowych roztworach hydrazyny stosowanych do usuwania grupy ftalilowej) dając wiele produktów, w tym produkty rozpadu wiązania fosfor-węgiel. Tak więc, nie udało się otrzymać w ten sposób 1-aminoalkanofosfonianów difenyłowych, czyli nie udało się osiągnąć podstawowego celu podjętych badań. Mimo to opisaną tu metodą rozdzielania można w prosty



sposób otrzymać optycznie aktywne kwasy 1-aminoalkanofosfonowe. Stosuje się ją jako metodę otrzymywania enancjomerów tych kwasów.

Imidy 59, otrzymywane z diastereomerycznych mieszanin amidów 55, można także rozdzielić przez krystalizację, przy czym jest to trudniejsze niż rozdział amidów. Niekiedy jest to jednak jedyna metoda. Na przykład, w taki sposób otrzymywaliśmy enancjomery fosfonowego analogu seryny



Również w przypadku amidów 59a i 59b w widmach $^1\text{H-NMR}$ obserwuje się różnice położenia sygnałów protonów metylenowych reszty dibenzolwinowej. W chloroformie sygnał ten, odpowiadający imidom 59b, leży zawsze przy wyższych wartościach δ niż w wypadku imidów 59a. Jest to zgodne z ogólną regułą opisaną przez Kolasę i Millera [109], którzy użyli imidów otrzymywanych z optycznie czynnych amin i bezwodnika dibenzolilo-L-winowego do określania konfiguracji amin za pomocą $^1\text{H-NMR}$.

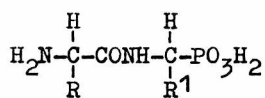
Rozdział amidów 55 i imidów 59 na diastereomery oraz zastosowanie tego sposobu do otrzymywania enancjomerów fosfonowych analogów alanyiny, waliny, leucyny, fenyloalaniny, fenyloglicyny, seryny, tyrozyny i dopa opisano w publikacjach [63], [88], [110].

5.3. Rozdział diastereomerycznych fosfonopeptydów za pomocą chromatografii jonowymiennej

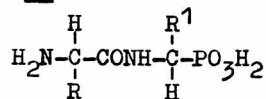
Jak wynika z poprzednich rozważań, otrzymanie czystych enancjomerów estrów kwasów aminoalkanofosfonowych nastrocza sporo trudności. Dlatego też interesującą możliwością wydał się bezpośredni rozdział diastereomerycznych fosfonopeptydów, produktów syntez, do których jako substratów używa się racemicznych kwasów aminofosfonowych lub ich estrów. Okazało się, że wystarczy w tym celu zastosować chromatografię jonowymienną. I tak w wyniku użycia silnie kwaśnego kationitu (Dowex 50W X8, 100-200 mesh, forma H^+) i prostego wymywania peptydów wodą otrzymuje się czyste diastereomery (tab. 14). Użycie kolumny o wymiarach 200x20 mm umożliwia rozdzielenie od 0,7 do 2,0 g mieszaniny diastereomerów z dobrymi wydajnościami. Ta metoda, chociaż stosunkowo czasochłonna, pozwala na otrzymanie gramowych porcji chromatograficznie jednorodnych produktów. Niektóre z peptydów zebranych w tab. 14 udało się rozdzielić przez krystalizację.

Konfigurację P-terminalnego aminofosfonianu w fosfonodipeptydzie można określić za pomocą relatywnej ruchliwości obu diastereomerów w chromatografii cienkowarstwowej i jonowymiennej. Okazało się bowiem, że zgodnie z ogólną zasadą obowiązującą dla klasycznych peptydów [111], [112] ruchliwość izomeru L,D (S,S w przypadku fosfonopeptydu) jest większa niż ruchliwość izomeru L,L (S,R). Tak więc izomery L,D są wymywane z kolumny jonowymiennej jako pierwsze i wędrują wyżej w chromatografii cienkowarstwowej (tab. 15). Fakt, że reguła ta obowiązuje również dla fosfonodipeptydów, został potwierdzony na podstawie danych z literatury dotyczących konfiguracji otrzymanych peptydów, a także przez hydrolizę diastereomerów i porównanie skręcalności otrzymanych w ten sposób kwasów aminofosfonowych z danymi z literatury dla kwasów o znanej konfiguracji.

Diastereomery fosfonopeptydów 16



izomer L-D (S-S)



izomer L-L (S-R)

R	R ¹	α_{578}^{20} (c 1, H ₂ O) (°)		
		LL + LD	LD	LL
Me (Ala)	Me	+12	+75	-49
Pr ⁱ (Val)		+38	+84	-9
Bu ⁱ (Leu)		+30	+73	-13
Me (Ala)	Et	+18	+75	-53
Bu ⁱ (Leu)		+25	+83	-22
Me (Ala)	Pr ⁱ	+12	+59	-24
Pr ⁱ (Val)		+37	+66	+7
Bu ⁱ (Leu)		+26	+51	+1
Pr ⁱ (Val)	Bu ⁱ	+30	+87	-23
Pr ⁱ (Val)	(CH ₂) ₂ COOH	-31 ^a	-	-34
Bu ⁱ (Leu) ^b		+28	+51	-14
(Pro)		-29 ^c	-29	-
Pr ⁱ (Val)	(CH ₂) ₃ COOH	+49 ^c	+49	-
(Pro)		-44 ^a	-	-44
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CON} \begin{array}{l} \diagup \square \diagdown \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array} \\ \\ \text{PO}_3\text{H}_2 \end{array}$		+27	+83	-22

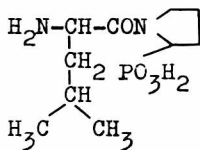
^a W syntezie otrzymuje się głównie izomer S,R,

^b Rozdzielony przez krystalizację,

^c W syntezie otrzymuje się głównie izomer S,S.

Wartości R_f otrzymane dla diastereomerycznych fosfonodipeptydów 16;
eluent: n-butanol-kwas octowy-woda (12:3:5)

R	R^1	Wartości R_f			
		Celuloza		Żel krzemionkowy	
		Izomer			
		LD	LL	LD	LL
Me (Ala)	Me			0,08	0,06
Pr ⁱ (Val)		0,60	0,46	0,15	0,10
Bu ⁱ (Leu)				0,23	0,17
Me (Ala)	Et			0,11	0,09
Bu ⁱ (Leu)		0,79	0,67	0,26	0,20
Me (Ala)	Pr ⁱ			0,28	0,21
Pr ⁱ (Val)		0,52	0,45	0,38	0,31
Bu ⁱ (Leu)				0,30	0,26
Pr ⁱ (Val)	Bu ⁱ	0,92	0,83	0,48	0,41
Pr ⁱ (Val)	$(CH_2)_2COOH$	0,48	0,30	0,21	0,15
Bu ⁱ (Leu)		0,54	0,45	0,27	0,21
(Pro)		0,19	0,24	0,08	0,12 ^a
Pr ⁱ (Val)	$(CH_2)_3COOH$	0,36	0,23	0,26	0,20
(Pro)		0,23	0,29	0,09	0,11 ^a

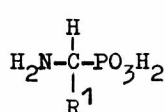


^a Zgodnie z ogólną regułą N-końcowa prolina powoduje odwrócenie relatywnej ruchliwości peptydów.

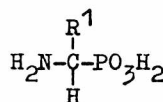
Przez hydrolizę rozdzielonych diastereomerycznych fosfono-peptydów otrzymywano enancjomery kwasów 1-aminoalkanofosfonowych (tab. 16). Rozdział diastereomerycznych fosfonodipeptydów i ich hydroliza jest więc dobrą metodą otrzymywania optycznie aktywnych kwasów aminofosfonowych. Otrzymaliśmy w ten sposób nie opisane dotąd enancjomery fosfonowych analogów kwasu glutaminowego, proliny kwasu 2-aminoadypinowego oraz kwasu 1-aminopropanofosfonowego.

T a b e l a 16

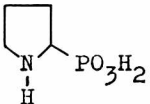
Optycznie aktywne kwasy 1-aminoalkanofosfonowe otrzymane z diastereomerycznych fosfonodipeptydów



S-izomer



R-izomer

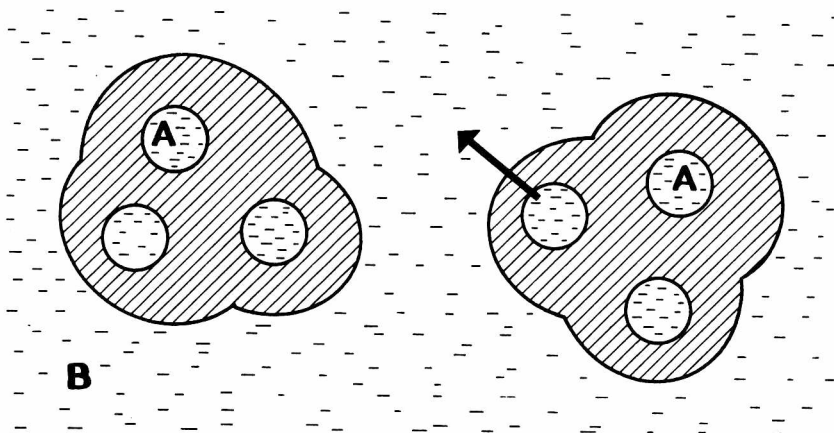
R ¹	[α] ₅₇₈ ²⁰ (c 1, 1M NaOH) (°)		Literaturowe [α] ₅₇₈ ²⁰ (c 1, 1M NaOH) (°)	
	Izomer			
	S	R	S	R
CH ₃	+17	-17	+16,8	-16,8 [106]
CH ₂ CH ₂	+21	-20		
CH(CH ₃) ₂	-0,8 ^a	+0,8	-0,6	+0,6 [110]
CH ₂ CH(CH ₃) ₂	+27	-28		
CH ₂ CH ₂ COOH	+21	-21		
(CH ₂) ₃ COOH	+13	-12		
	-60	+64		

^a (c 5, H₂O).

Badania przedstawione w tym podrozdziale zostały opisane w pracach [66], [113], [114].

5.4. Próby rozdziału diastereomerycznych fosfonodipeptydów za pomocą ciekłych membran emulsyjnych

Ciekłe membrany, które są uważane za modele błon biologicznych, cieszą się coraz większym zainteresowaniem jako potencjalna, nowa technika rozdziału i zateżenia substancji chemicznych. Różne aspekty zastosowań takich membran oraz różne typy procesów rozdziału zostały wyczerpująco opisane przez Webera [115]. Ciekłe membrany emulsyjne to specyficzna odmiana standardowej ekstrakcji. Technika ta umożliwia rozdzielanie gramowych ilości substancji różniących się nieznacznie budową chemiczną. Postanowiłem zatem sprawdzić, czy nadaje się ona do rozdziału diastereomerycznych fosfonodipeptydów. W literaturze jest niewiele prac



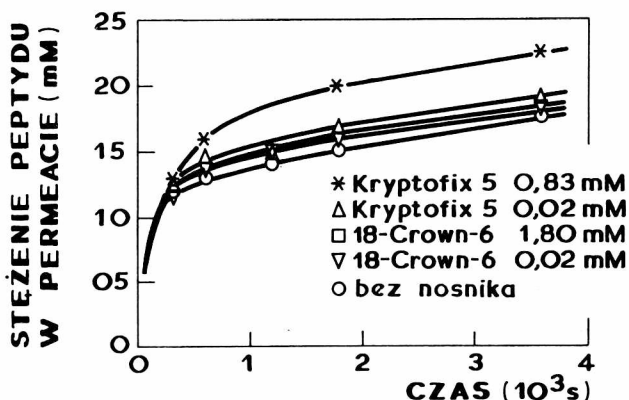
Rys. 3. Schematyczne przedstawienie sposobu działania ciekłej membrany emulsyjnej (kierunek transportu peptydów zaznaczono strzałką)
 Fig. 3. Schematic representation of the mode of action of liquid emulsion membrane (the transportation direction is indicated by arrow)

opisujących transport aminokwasów przez ciekłe membrany rozpuszczalników organicznych [116]-[125], a transport peptydów nie został dotychczas opisany. Podjęliśmy zatem badania podstawowe, których celem było znalezienie optymalnych warunków permeacji aminokwasów i peptydów przez ciekłe membrany emulsyjne.

W badaniach tych tworzone emulsję wodnego roztworu peptydu i czterochlorku węgla. Emulsję tę zawieszano, delikatnie mieszając, w wodzie destylowanej. W ten sposób otrzymywano zdyspergowaną fazę wodną zawierającą peptyd (surowiec, faza A na rys. 3), oddzieloną cienką (grubości 1-10 μm) warstwą czterochlorku węgla od fazy wodnej, do której transportowany jest peptyd (permeat, faza B na rys. 3). Czterochlorek węgla stanowi membranę między tymi dwiema fazami wodnymi. W czterochlorku węgla rozpuszczano związek makrocycliczny, który kompleksując peptyd przenosi go przez membranę organiczną. Tak więc proces transportu wymuszany jest przez gradient stężeń.

Dipeptydy i fosfonodipeptydy są transportowane przez opisane tu membrany, przy czym równowaga osiągana jest już po 10-20 minutach (rys. 4). Szybkość permeacji silnie zależy od stężenia środka powierzchniowo czynnego użytego w celu przeciwdziałania rozpadowi emulsji (Rokwin 60 - mieszanina estrów wyższych kwasów tłuszczowych z sorbitem - produkowany przez NZPO "Rokita" w Brzegu Dolnym). Zależność od użytego nośnika makrocyclicznego jest mniej widoczna (rys. 4).

Zdolności transportujące użytych eterów koronowych układają się w szeregu: Kryptofix 5 > Kryptofix 222 > Kryptofix 22 > 18-korona-6. Wydaje się więc, że istnieje tu transport kombinowany: transport peptydów za



Rys. 4. Zmiany stężenia kwasu 1-(N-L-waliloamino)etanofosfonowego w permeacji w trakcie procesu; stężenie Rokwinu 60 w fazie organicznej wynosiło 4% (g/g)

Fig. 4. The changes of the concentration of 1-(N-L-valylamino)ethylphosphonic acid during the permeation process; Rokwin 60 concentration in organic phase was 4% (per weight)

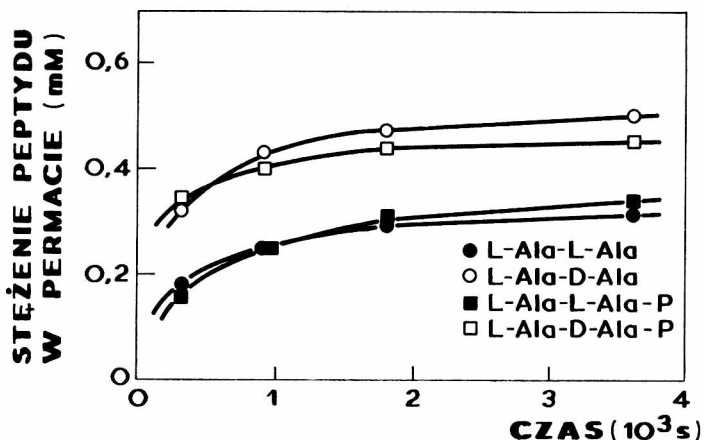
pomocą odwrótnych micel tworzonych przez surfaktant w fazie organicznej oraz transport za pomocą makrocyclicznego nośnika, który kompleksuje grupę NH_2^+ peptydu. Wszystkie zbadane przez nas mieszaniny diastereomeryczne fosfonodipeptydów są dobrze transportowane przez emulsyjne membrany z czterochlorku węgla (tab. 17).

Aby zaprojektować metodę rozdzielania fosfonodipeptydów na diastereomery, należało zbadać, czy w układzie emulsyjnym występuje dyskryminacja chiralna, to znaczy, czy diastereomery są transportowane z różną szybkością. Badaliśmy więc kinetykę transportu L-Ala-L-Ala, L-Ala-D-Ala oraz ich fosfonowych analogów L-Leu-L-Phe i L-Leu-D-Phe, L-Val-L-Ala i L-Val-D-Ala oraz diastereomerów fosfonowego analogu leucyloalaniny przez membrany zawierające tylko środek powierzchniowo czynny (dodanie makrocyclicznego nośnika do układu zwiększa co prawda szybkość transportu dipeptydów, ale drastycznie obniża stereoselektywność procesu). We wszystkich przypadkach izomer L,D jest transportowany szybciej niż izomer L,L (reprezentatywny przykład pokazałem na rys. 5), w niektórych przypadkach nawet trzy razy szybciej. Klasyczne peptydy przepływają przez membranę szybciej niż ich fosfonowe analogi. Przeprowadzenie peptydów w bromowodorki zmniejsza szybkość permeacji, wpływając tylko nieznacznie na diastereoselektywność procesu.

Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić, że możliwe jest opracowanie metody rozdzielania diastereomerycznych peptydów (w tym i fosfonopeptydów) za pomocą ciekłych membran emulsyjnych. Wymaga to jednak wielu badań o charakterze podstawowym.

Szybkości permeacji (mM godz.^{-1}) fosfonodipeptydów i glicylohistydyny przez membranę z czterochlorku węgla stabilizowaną Rokwinem 60 i zawierającą lub nie Kryptofix 5 (stężenie $0,83 \text{ mM}$)

Peptyd	Stężenie Rokwinu 60			
	z nośnikiem		bez nośnika	
	2%	4%	2%	4%
$\text{Val-NH-CH-PO}_3\text{H}_2$ $\quad \quad $ $\quad \quad \text{CH}_3$	0,625	0,625	0,155	0,225
$\text{Ala-NH-CH-PO}_3\text{H}_2$ $\quad \quad $ $\quad \quad \text{C}_6\text{H}_{11}$	0,495	0,625	0,370	0,505
$\text{Val-NH-CH-PO}_3\text{H}_2$ $\quad \quad $ $\quad \quad \text{CH}_2\text{Ph}$	0,430	0,510	0,155	0,235
$\text{Ala-NH-CH-PO}_3\text{H}_2$ $\quad \quad $ $\quad \quad \text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$	-	0,070	-	0,030
GlyHis	0,420	0,430	0,160	0,250



Rys. 5. Stereoselektywność transportu alanyloalaniny i jej fosfonowego analogu przez ciekłą membranę emulsyjną; stężenie Rokwinu 60 w fazie organicznej wynosiło 4% (g/g)

Fig. 5. Stereoselectivity of the transportation of alanylalanine and its phosphonic analogue through liquid emulsion membrane; the concentration of Rokwin 60 in organic phase was 4% (per weight)

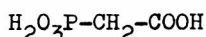
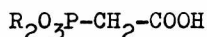
Wyniki opisane w tym podrozdziale zostały zamieszczone w postaci komunikatów w materiałach pokonferencyjnych [126], [127].

6. FOSFONOACETYLOAMINOKWASY I FOSFONOACETYLOAMINOFOSFONIANY

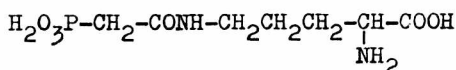
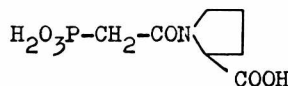
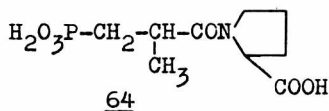
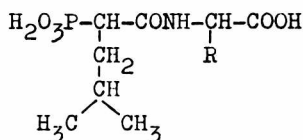
Zainteresowanie fosfonoacetyloaminokwasami datuje się od odkrycia, że kwas (N-fosfonoacetylo)asparaginowy 8 (PALA) jest silnym inhibitorem karbamoilotransferazy asparaginianowej [18], drugiego enzymu szlaku biosyntezy pirymidyn. Związek ten wykazuje też interesującą aktywność przeciwnowotworową [35], [128].

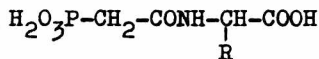
Synteza PALA sprawiała wiele trudności wynikających ze specyficznych właściwości grupy fosfonowej. Jako substratów używano zarówno wolnego kwasu fosfonoctowego 60, jak i jego estrów 61 P,P-dibenzylowych, -diallilowych i -difenyloowych [35]. W celu otrzymania PALA zastosowano też wiele klasycznych, znanych z chemii peptydów metod tworzenia wiązania amidowego. Mimo szeroko zakrojonych badań wydajności tych syntez są jednak niezadowolające.

Ponieważ dla otrzymania N-fosfonoacetyloaminokwasów należało rozwiązać te same problemy, jakie występują w syntezie fosfopeptydów, opis syntezy tych pochodnych został włączony do tej pracy.

6061

Późniejsze lata przyniosły doniesienia o różnorodnej aktywności biologicznej innych niż PALA N-fosfonoacetyloaminokwasów. Najciekawsze przykłady to: N-fosfonoacetyloornityna 62 (PALO) [129], [130], silny inhibitor karbamoilotransferazy ornitynowej, jednego z kluczowych enzymów biosyntezy puryn; inhibitory 63 i 64 enzymu konwertującego angiotensynę (potencjalne środki przeciw nadciśnieniu [131]-[133]) oraz inhibitory 65 i 66 enkefalinazy [134], [135].

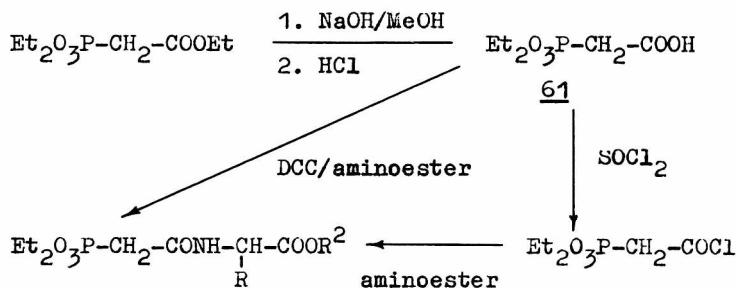
62636465

66

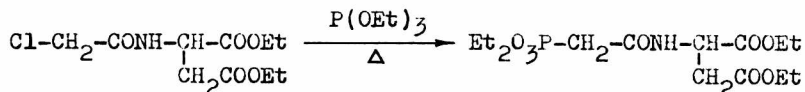
Poszukując regulatorów wzrostu roślin zauważyłem, że nie badano nigdy, czy N-fosfonoacetyloaminokwasy mają taką aktywność i dlatego podjąłem syntezę tych połączeń.

6.1. Synteza N-fosfonoacetyloaminokwasów

W czasie, gdy podejmowałem próby syntezy N-fosfonoacetyloaminokwasów, znane były tylko PÅLA i PALO, a opisanych było zaledwie kilka metod ich otrzymywania. We wszystkich tych metodach substratem był kwas fosfonoctowy. Postanowiłem zatem zastosować estry dialkylowe kwasu fosfonoctowego 61 i metody chlorków kwasowych oraz DCC dla tworzenia wiązania amidowego. SelektYWna, zasadowa hydroliza fosfonoctanu trietylowego daje odpowiednią sól sodową, którą łatwo przeprowadzić w substrat 61 sprzęgany następnie z estrami aminokwasów metodami DCC i chlorków kwasowych. Wydajności produktów 67 tych reakcji były co najwyżej zadowalające (tab. 18).

67

W roku 1979 Lesiak i Stec [136] opisali inne, oryginalne i atrakcyjne rozwiązanie problemu syntezy N-fosfonoacetyloaminokwasów. Zaproponowali oni mianowicie, aby tworzenie wiązania fosfor-węgiel było końcowym etapem syntezy PÅLA:

68

Estry trialkilowe 67 i sole 70 N-fosfonoacetyloaminokwasów

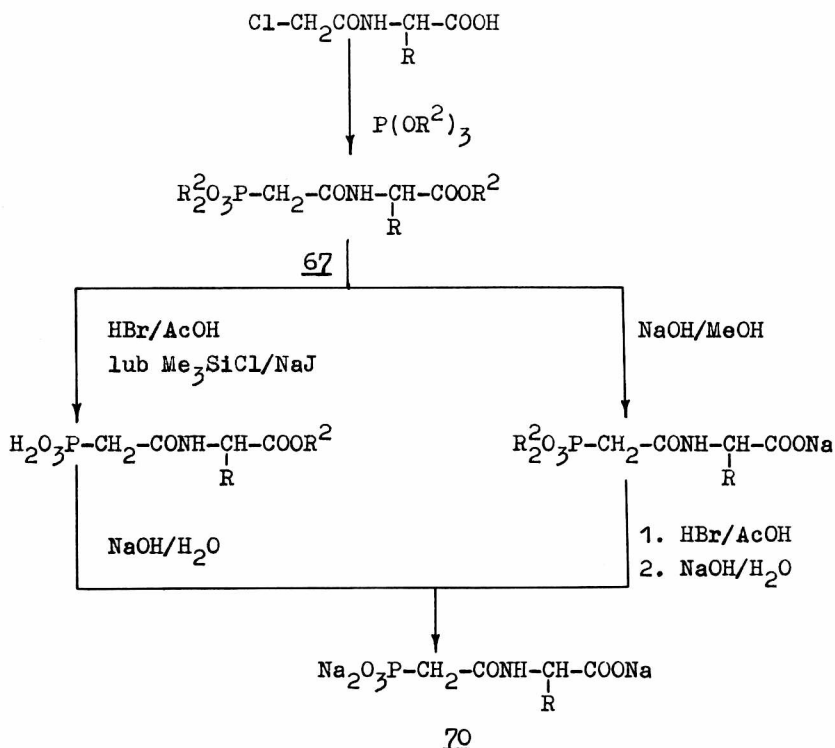
Związki <u>67</u>				Związki <u>70</u>		
R	R ²	Metoda ^a	Wyd. (%)	R	Metoda ^b	Wyd. (%)
H	Et	A	85	H	E	85
		B	85			
		C	7			
Me	Et	A	84	Me	E	85
		C	9		F	85
		D	21			
Pr ⁱ	Me	A	98	Pr ⁱ	E	87-90
Pr ⁱ	Et	A	90			
Bu ⁱ	Et	C	56	Bz	E	74-86
		D	33			
Bz	Me	A	97	Bz	E	74-86
Bz	Et	A	95			
CH ₂ COOMe	Me	A	97	CH ₂ COONa	E	82-84
		C	97		F	80
CH ₂ COOEt	Et	A	92	(CH ₂) ₂ COONa	E	83
		C	31			
(CH ₂) ₂ COOEt	Et	A	84	(CH ₂) ₂ COONa	E	83
		C	34			
		D	66			

^a Substraty: A - chloroacetyloaminokwasy; B - bromoacetyloglicyna; C - chlorek estru P,P-dietylowego kwasu fosfonoctowego; D - kwas P,P-dietoksyfosfonoctowy i estry metylowe aminokwasów/metoda DCC.

^b E - hydroliza a następnie acydoliza; F - acydoliza a następnie hydroliza.

Jednak i w tej syntezie wydajność produktu jest umiarkowana, co jest wynikiem rozkładu estru 68 w wysokiej temperaturze, w jakiej prowadzi się reakcję Arbuzowa.

Dobre wyniki dała opracowana przez nas modyfikacja tej procedury polegająca na tym, że reakcji Arbuzowa poddaje się N-chloroacetyloaminokwasy 69. Reakcji tej towarzyszy estryfikacja reszt karboksylowych, a produkty 67 otrzymuje się z wysokimi wydajnościami (tab. 18). Otrzymane estry łatwo przeprowadza się w ich sole sodowe 70.



Omówione w tym podrozdziale syntezы zostały częściowo opisane w Synthesis [137].

Otrzymane związki wykazują umiarkowaną aktywność herbicydową [138], przy czym silniej działają one na rośliny dwuliścienne. Badania aktywności cytostatycznej wykazały, że prócz PALA nie hamują one wzrostu komórek KB ludzkiego nowotworu w hodowli komórkowej [139].

6.2. Synteza N-fosfonoacetyloaminofosfonianów

PALA mimo interesującego spektrum aktywności przeciwrakowej (np. daje on obiecujące wyniki w leczeniu nowotworów płuc) nie został wprowadzony do terapii. Choć w komórkach rakowych jest osiągany poziom leku niezbędny do zahamowania aktywności transkarbamoylotransferazy asparaginianowej, bariery w jego przenikalności przez błony komórkowe uniemożliwiają dotarcie PALA do miejsca działania [140], [141]. Tym samym skuteczność leku jest mała. Poszukuje się zatem takich modyfikacji strukturalnych, dzięki którym można by zachować działanie leku przy jednoczesnym umożliwieniu transportu przez błony komórkowe. Jedną z takich modyfikacji może być zamiana jednej z grup karboksylowych w PALA na resztę fosfonową. Podjąłem więc próbę syntezy takich połączeń.

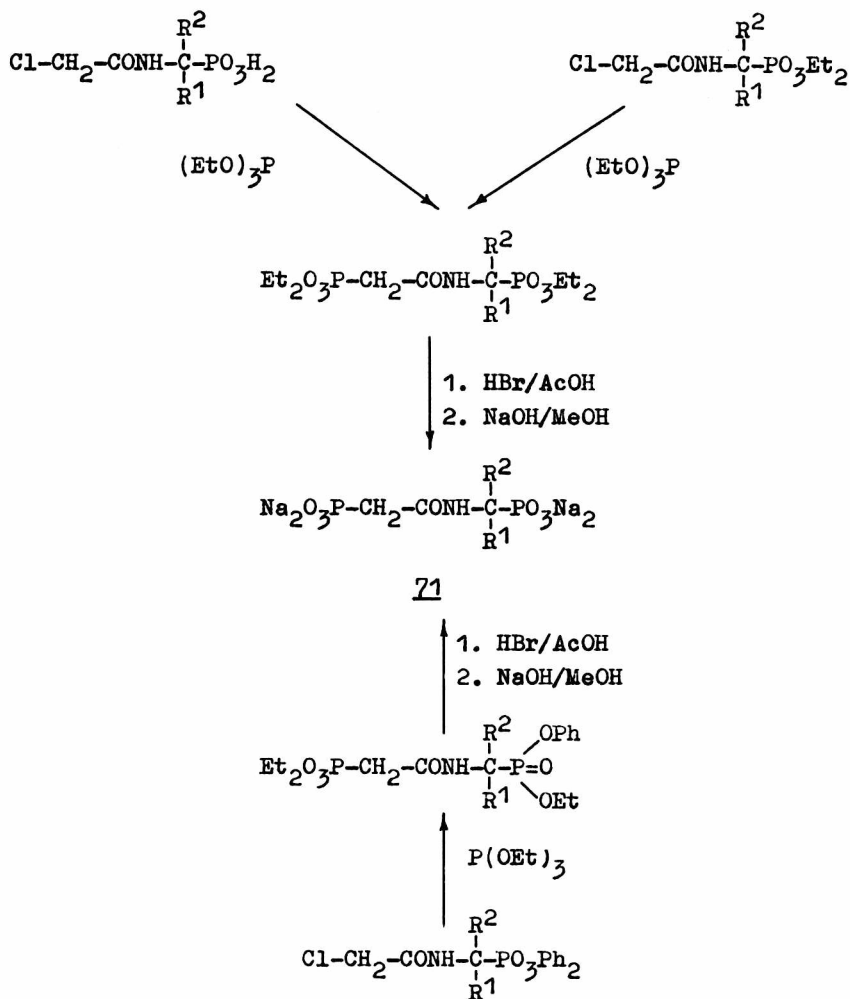
T a b e l a 19

Sole sodowe 71 N-fosfonoacetyloaminofosfonianów

R ¹	R ²	Metoda ^a	Wydajność (%)
H	CH ₂ COONa	A	42
H	Me	A	22
		C	63,5
Me	Me	A	29
H	Pr ⁱ	A	28
		C	63
H	Pr ⁿ	A	16
		C	72
H	Bu ⁱ	C	71
H	Bu ^t	B	14,5
- (CH ₂) ₄ -		A	22
H	(CH ₂) ₂ COONa	B	22
H	(CH ₃) ₃ COONa	B	15
H	Pr ^c	B	26,5
H	Bu ^c	B	11
H	Pen ^c	B	21
H	Hex ^c	B	21
$\text{Na}_2\text{O}_3\text{P}-\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\text{CH}_2\text{PO}_3\text{Na}_2}{\text{CH}}-\text{COONa}$		A	7,5
$\text{Na}_2\text{O}_3\text{P}-\text{CH}_2-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_3\text{PO}_3\text{Na}_2$		B	20
$\text{Na}_2\text{O}_3\text{P}-\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}}-\text{PO}_2\text{Na}_2$		A	55
$\text{Na}_2\text{O}_3\text{P}-\text{CH}_2-\text{CONH}-\underset{\text{Et}}{\overset{\text{ONa}}{\text{CH}_2}}-\text{P}=\text{O}$		A	61,5

^a Substraty: A - kwasy N-chloroacetyloaminoalkanofosfonowe; B - N-chloroacetyloaminoalkanofosfoniany dietylowe; C - estry difenylowe.

Synteza N-fosfonoacetyloaminofosfonianów sprawia spore trudności. Najprostszym sposobem wydawało się powtórzenie metody zastosowanej do syntezy N-fosfonoacetyloaminokwasów. Możliwości tej metody są limitowane trudnością otrzymania kwasów N-chloroacetyloaminofosfonowych. W wyniku zastosowania estrów dietylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych z dobrymi wydajnościami powstają ich chloroacetylowe pochodne. Jednak, podobnie jak w przypadku estrów N-chloroacetyloaminokwasów, pochodne te



są nietrwałe w warunkach reakcji Arbuzowa. Tymi dwiema metodami można otrzymać pożądane produkty 71 z umiarkowanymi wydajnościami (tab. 19). Dobre rezultaty dało zastosowanie 1-aminoalkanofosfonianów difenylowych jako substratów. Reakcja fosforynu trietylowego z otrzymywanymi z nich N-chloroacetyloaminofosfonianami difenyłowymi przebiega gładko i towarzyszy jej reakcja transestryfikacji jednej grupy estrowej. W wyniku otrzymuje się mieszane estry etylo-fenyłowe 72. Przebieg tej reakcji jest zaskakujący, gdyż 1-(N-benzylksykarbonylamino)alkanofosfoniany difenyłowe nie są transestryfikowane fosforynem trietylowym. Również fakt, że użycie bromowodoru w kwasie octowym pozwala uzyskać produkt 71 jest zaskakujący, gdyż estry difenyłowe są trwałe w warunkach acydolizy. Metodą tą uzyskuje się pożądane produkty z dobrymi wydajnościami (tab.19).

Żaden z otrzymanych związków nie wykazywał właściwości cytostatycznych w stosunku do komórek KB ludzkiego mięsaka. Użyty w tym samym teście jako związek kontrolny PALA hamował wzrost komórek nowotworowych ($ID_{50} = 240 \text{ ug ml}^{-1}$).

Wyniki opisane w tym podrozdziale zostały opublikowane w *Journal of Medicinal Chemistry* [142].

Wyniki opisane w rozdziale 6 pokazują, jak wiele trudności sprawia synteza pochodnych peptydowych, gdy jeden ze składników zawiera grupę fosfonową. Metody stosowane w syntezie klasycznych peptydów mają tu ograniczone zastosowanie, czego dowodem może być fakt, że znacznie lepsze wyniki w syntezie N-fosfonoacetyloaminokwasów otrzymuje się po wprowadzeniu wiązania fosfor-węgiel w ostatnim etapie syntezy, to jest już po utworzeniu wiązania amidowego.

Panu Profesorowi Przemysławowi Mastalerzowi serdecznie dziękuję za opiekę i pomoc, której udzielał mi od początku mojej pracy naukowej. Szczególnie serdecznie pragnę podziękować Pani Doktor Barbarze Lejczak, wraz z którą od dziesięciu lat prowadzimy badania nad syntezą i działaniem biologicznym aminofosfonianów i ich krótkich peptydów. Dziękuję również wszystkim Koleżankom i Kolegom, z którymi współpraca umożliwiła mi wykonanie tej pracy.

7. LITERATURA

- [1] Anonymus, *Chem. Eng. News* 56 (1965).
- [2] CHAVANE V., *Ann. Chim. (Paris)* 4, 372 (1949).
- [3] CHAVANE V., *Bull. Soc. Chim. Fr.* 774 (1948).
- [4] CHAVANE V., *Compt. Rend.* 224, 4068 (1947).
- [5] RUMPF P., CHAVANE V., *Compt. Rend.* 224, 9191 (1947).
- [6] Horiguchi M., KANDATSU M., *Nature (London)* 184, 901 (1959).
- [7] HILDEBRAND L.R., CURLEY-JOSEPH J., LUBANSKY H.J., HENDERSON T.O., *Topics in Phosphorus Chemistry*, Vol. 11, M.Grayson i E.J.Griffith, Interscience, New York-London 1983, s. 297-338.
- [8] *Biochemistry of Natural C-P Compounds*, T.Hori, M.Horiguchi, A.Hayashi eds., Maruzen Ltd., Kyoto 1984.
- [9] KAFARSKI P., MASTALERZ P., *Beiträge zur Wirkstoffforschung*, z. 21, (1984).
- [10] MOSCHIDIS M.C., *Progr. Lipid Res.* 23, 223 (1985).
- [11] KAFARSKI P., MASTALERZ P., *Roczniki Chemii* 51, 433 (1977).
- [12] POROSHIN K.T., BURITCHENKO V.K., *Dokl.Akad.Nauk SSSR* 156, 386, (1964).
- [13] POROSHIN K.T., BURITCHENKO V.K., *Dokl.Akad.Nauk Tadzh. SSR* 6, 16 (1963).
- [14] BURITCHENKO V.K., POROSHIN K.T., DAVIDYANT S.B., KUZYAT L.S., *Dokl.Akad.Nauk Tadzh. SSR* 2, 17 (1966).

- [15] KNOLL H., KRALL M., Brit. Pat. 912.920 (1962).
- [16] PRALON J.C., JENSEN H., NEUZIL E., Bull.Soc.Pharm. Bordeaux 109, 85 (1970).
- [17] ISSLEIB K., KÜMMEL R., Chem. Ber. 100, 1335 (1967).
- [18] COLLINS K.D., STARK G.R., J.Biol.Chem., 246, 6599 (1971).
- [19] BAYER E., GUGEL K.H., HAGELE M., HAGEMAIER H., JESSIPOV S., KÖNIG W.A., ZÄHNER H., Helv.Chim.Acta 55, 224 (1972).
- [20] OGAWA Y., YOSHIDA M., INOUE S., NIIDA T., Sci.Rep. Meiji Seika Kaisha 13, 54 (1973).
- [21] KONDO Y., SHOMURA T., OGAWA Y., TSURUOKA T., WATANABE H., TUTSUKAWA K., SUZUKI T., MORIYAMA C., INOUE S., NIIDA T., Sci.Rep. Meiji Seika Kaisha 13, 34 (1973).
- [22] OGAWA Y., TSURUOKA T., INOUE S., NIIDA T., Sci.Rep. Meiji Seika Kaisha 13, 42 (1973).
- [23] ALLEN J.G., ATHERTON F.R., HALL M.J., HASSALL C.H., HOLMES S.W., LAMBERT R.W., NISBET L.J., RINGROSE P.S., Nature (London) 272, 56 (1978).
- [24] YAMAUCHI K., KINOSHITA M., IMOTO M., Bull.Chem.Soc.Jpn. 45, 2528 (1972).
- [25] HARIHARAN M., CHABERER S., MARTELL A.E., Synth.Comm. 3, 375 (1973).
- [26] JACOBSEN N.E., BARTLETT P.A., Am.Chem.Soc.Symp.Ser. 171, 221 (1981).
- [27] JACOBSEN N.E., BARTLETT P.A., J.Am.Chem.Soc. 103, 654 (1981).
- [28] YAMAUCHI K., OHTSUKI S., KINOSHITA M., Biochim.Biophys.Acta 827, 275 (1985).
- [29] GREENLEE W.J., HARRIS E.E., PATCHETT A.A., THORSETT E.D., U.S. Pat. 4.379.146 (1983).
- [30] ELLIOTT R.L., MARKS N., BERG M.J., PORTHOGESE P.S., J.Med.Chem. 28, 1208 (1985).
- [31] MOOKHTIAR K.A., MARLOWE C.K., BARTLETT P.A., van WART H.E., Biochemistry 26, 1962 (1987).
- [32] BARTLETT P.A., LAMDEN L.A., Bioorg.Chem. 14, 356 (1986).
- [33] BARTLETT P.A., MARLOWE C.K., Biochemistry 22, 4618 (1983).
- [34] YAMAUCHI K., MITSUDA Y., KINOSHITA M., Bull.Soc.Chem. Jpn. 48, 3285 (1975).
- [35] KAFARSKI P., LEJCZAK B., MASTALERZ P., Beiträge zur Wirkstofforschung, z. 25 (1985).
- [36] ALLEN J.G., ATHERTON F.R., HALL M.J., HASSALL C.H., HOLMES S.W., LAMBERT R.W., NISBET L.J., RINGROSE P.S., Antimicrob.Agents Chemother. 15, 684 (1979).
- [37] KAMETANI T., KIGASAWA K., HIIRAGI M., WAKISAKA K., HAGA S., SUGI H., TANIGAWA K., SUZUKI Y., FUKAWA K., IRINO O., SAITA O., YAMABE S., Heterocycles 16, 205 (1981).
- [38] KAMETANI T., SUZUKI Y., KIGASAWA K., HIIRAGI M., WAKISAKA K., SUGI H., TANIGAWA K., FUKAWA K., IRINO O., SAITA O., YAMABE S., Heterocycles 18, 295 (1982).
- [39] ATHERTON F.R., HASSALL C.H., LAMBERT R.W., J.Med.Chem. 29, 29 (1986).
- [40] KUKHAR V.P., SOLODENKO V.A., Usp.Khim. 56, 1504 (1987).

- [41] HARIHARAN M., MOTEKAJTIS R.J., MARTELL A.E., *J.Org.Chem.* 40, 470 (1975).
- [42] SOROKA M., Wybrane problemy kwasów aminofosfonowych, *Pr.Nauk.Inst. Chem.Org. PWr.*, z. 32, Wrocław 1987.
- [43] KAFARSKI P., SOROKA M., LEJCZAK B., *Peptide Chemistry 1987*, T.Shiba, S.Sakakibara eds., Protein Research Foundation, Osaka 1988, s. 307.
- [44] RAMAGE R., ATRASH B., HOPTON D., PARROT M.J., *J.Chem.Soc. Perkin I* 1617 (1985).
- [45] ARENDT A., KOŁODZIEJCZYK A., *Synthesis* 362 (1983).
- [46] KAFARSKI P., LEJCZAK B., *Synthesis* 307 (1988).
- [47] KARANEWSKY D.S., PETRILLO E.W.Jr., *Eur.Pat.Appl.* O.099.785 (1984).
- [48] HARVEY D.J., HORNING M.G., *J.Chromatogr.* 79, 65 (1973).
- [49] HARVEY D.J., HORNING M.G., *Org.Mass Spectrom.* 9, 111 (1974).
- [50] BIRKOFER L., KONKOL W., RITTER A., *Chem.Ber.* 94, 1263 (1961).
- [51] BIRKOFER L., RITTER A., NEUHAUSEN P., *Ann.Chem.* 659, 190 (1962).
- [52] KRICHELDORF H.R., *Liebigs Ann.Chem.* 763, 17 (1972).
- [53] KABACHNIK M.I., MEDVED T.Ya., *Izv.Akad.Nauk SSSR, ser.khim.* 868 (1953).
- [54] KABACHNIK M.I., MEDVED T.Ya., *Izv.Akad.Nauk SSSR, ser.khim.* 1024 (1954).
- [55] MEDVED T.Ya., KABACHNIK M.I., *Dokl.Akad.Nauk SSSR*, 84, 117 (1952).
- [56] MEDVED T.Ya., KABACHNIK M.I., *Izv.Akad.Nauk SSSR, ser.khim.* 314 (1954).
- [57] ASANO S., KITAHARA T., OGAWA T., MATSUI M., *Agr.Biol.Chem.* 37, 1193 (1973).
- [58] KOWALIK J., KUPCZYK-SUBOTKOWSKA L., MASTALERZ P., *Synthesis* 57 (1981).
- [59] ARENDT A., HOFFMANN M., KOŁODZIEJCZYK A., SOBCZAK A., SOKOŁOWSKA T., WASIELEWSKI C., *Pol.J.Chem.* 53, 447 (1979).
- [60] KUPCZYK-SUBOTKOWSKA L., MASTALERZ P., *Int.J.Peptide Protein Res.* 21, 485 (1983).
- [61] GILMORE W.F., McBRIDE M.A., *J.Pharm.Sci.* 63, 1087 (1972).
- [62] PRASAD K.U., IQBAL M.A., URRY D.W., *Int.J.Pept. Protein Res.* 7, 295 (1985).
- [63] LEJCZAK B., KAFARSKI P., MAKOWIECKA E., *Biochem.J.* 242, 81 (1987).
- [64] LEJCZAK B., KAFARSKI P., SZTAJER H., MASTALERZ P., *J.Med.Chem.* 29, 2212 (1987).
- [65] KUPCZYK-SUBOTKOWSKA L., KAFARSKI P., KOWALIK J., LEJCZAK B., MASTALERZ P., OLEKSYSZYN J., SZEWCZYK J., *Am.Chem.Soc.Symp. Ser.* 171, 187 (1981).
- [66] KAFARSKI P., LEJCZAK B., MASTALERZ P., SZEWCZYK J., WASIELEWSKI C., *Can.J.Chem.* 60, 3081 (1982).
- [67] LEJCZAK B., KAFARSKI P., GANCARZ R., JASKULSKA E., MASTALERZ P., WIECZOREK J.S., KRÓL M., *Pestic.Sci.* 16, 227 (1985).
- [68] LEJCZAK B., KAFARSKI P., GANCARZ R., *Pestic.Sci.* 18, 263 (1988).
- [69] LEJCZAK B., KIJAS-KACZANOWSKA M., *Peptide Chemistry 1987*, T.Shiba, S.Sakakibara eds., Protein Research Foundation, Osaka 1988, s. 315.

- [70] SCHNEIDER G., *Naturwissenschaften* 51, 416 (1964).
- [71] GANCARZ R., WIECZOREK J.S., *J.Prakt.Chem.* 322, 213 (1980).
- [72] CZERWIŃSKI W., GANCARZ R., PRZYBYŁKA E., WIECZOREK J.S., *Acta Agrobot.* 34, 253 (1982).
- [73] KINGSBURY W.D., BOEHM J.C., MEHTA R.J., GRAPEL S.F., *J.Med.Chem.* 26, 1725 (1983).
- [74] NEUHAUS F.C., HAMMES W.P., *Pharm.Ther* 14, 265 (1981).
- [75] THOMAS W.A., *Biochem.Soc.Trans.* 14, 383 (1986).
- [76] BADET B., *Actual.Chim.Ther.* 13, 315 (1986).
- [77] KAFARSKI P., LEJCZAK B., MASTALERZ P., *Wiadomości Chemiczne* 40, 425 (1986).
- [78] GANCARZ R., WIELKOPOLSKI W., JASKULSKA E., KAFARSKI P., LEJCZAK B., MASTALERZ P., WIECZOREK J.S., *Pestic.Sci.* 16, 234 (1985).
- [79] GANCARZ R., KAFARSKI P., LEJCZAK B., MASTALERZ P., WIECZOREK J.S., PRZYBYŁKA E., CZERWIŃSKI W., *Phosphorus Sulfur* 18, 373 (1983).
- [80] Gerlan Pharmaceutical Co Ltd., Japan Kokai Tokyo Koho 58.13. 593 (1983), *C.A.* 99, 38635 (1983).
- [81] KAFARSKI P., LEJCZAK B., GANCARZ R., JASKULSKA E., MASTALERZ P., WIECZOREK J.S., ZBYRYT I., *Pestic.Sci.* 16, 239 (1985).
- [82] OLEKSYSZYN J., SUBOTKOWSKA L., MASTALERZ P., *Synthesis* 985 (1979).
- [83] OLEKSYSZYN J., KUPCZYK-SUBOTKOWSKA L., MASTALERZ P., V Ogólnopolska Konferencja Chemii Aminokwasów i Peptydów, Łódź 1979 (streszczenie 59).
- [84] OLIGVIE K.K., BEAUCAGE S.L., *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 443 (1976).
- [85] OLIGVIE K.K., BEAUCAGE S.L., *Nucleic Acid Res.* 7, 805 (1979).
- [86] SZEWCZYK J., LEJCZAK B., KAFARSKI P., *Synthesis* 409 (1982).
- [87] LEJCZAK B., KAFARSKI P., SZEWCZYK J., *Synthesis* 412 (1982).
- [88] LEJCZAK B., KAFARSKI P., SOROKA M., MASTALERZ P., *Synthesis* 577 (1984).
- [89] ATHERTON F.R., HALL M.J., HASSALL C.H., LAMBERT R.W., RINGROSE P.S. *Ger.Offen.* 26.02.193 (1976).
- [90] ATHERTON F.R., HALL M.J., HASSALL C.H., LAMBERT R.W., RINGROSE P.S. *Ger.Offen.* 27.21.761 (1977).
- [91] HOFMANN Le ROCHE, *Austr. Pat.* 342.192 (1977).
- [92] ATHERTON F.R., HASSALL C.H., LAMBERT R.W., *Brit. Pat.* 81.57.793 (1981).
- [93] ATHERTON F.R., HALL M.J., HASSALL C.H., LAMBERT R.W., RINGROSE P.S., *Ger.Offen.* 27.32.454 (1978).
- [94] ATHERTON F.R., HASSALL C.H., LAMBERT R.W., *J.Med.Chem.* 29, 29 (1986).
- [95] KUPCZYK-SUBOTKOWSKA L., MASTALERZ P., *Int.J.Pept. Protein Res.* 21 485 (1983).
- [96] WASIELEWSKI C., SOBCZAK A., V Ogólnopolska Konferencja Chemii Aminokwasów i Peptydów, Łódź 1979 (streszczenie) 31.
- [97] BAJUSZ S., RONAI A., SZEKELY J.I., TURAN A., JUHASZ A., PATHY A., MIGLECZ E., BERZETEI I., *FEBS Lett.* 117, 308 (1980).
- [98] DHAWAN B., REDMIRE D., *Phosphorus Sulfur* 32, 119 (1987).

- [99] BELOV Yu.P., DAVANKOV V.A., ROGOZHIN S.V., *Izv.Akad.Nauk SSSR, ser. Khim.* 1596 (1977).
- [100] BELOV Yu.P., RAKHNOVICH G.B., DAVANKOV V.A., GODOVIKOV N.M., ALEXANDROV G.G., STRUTCHKOV Yu.T., *Izv.Akad.Nauk SSSR, ser. Khim.* 1125 (1980).
- [101] KOWALIK J., SAWKA-DOBROWOLSKA W., GŁOWIAK T., *J.Chem.Soc.Chem. Commun.* 446 (1984).
- [102] JANAS K.M., FILIPIAK A., KOWALIK J., MASTALERZ P., KNYPL J.S., *Acta Biochim.Pol.* 32, 131 (1985).
- [103] KOWALIK J., ZYGMUNT J., MASTALERZ P., *Phosphorus Sulfur* 18, 393 (1983).
- [104] KOWALIK J., KAFARSKI P., MASTALERZ P., *V Ogólnopolska Konferencja Chemii Aminokwasów i Peptydów, Łódź 1979 (streszczenie)* 31.
- [105] KOLASA T., CHIMIĄK A., *Roczniki Chemii* 50, 367 (1976).
- [106] ATHERTON F.R., HALL M.J., HASSALL C.H., LAMBERT R.W., RINGROSE P.S., *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 677 (1979).
- [107] GŁOWIAK T., SAWKA-DOBROWOLSKA W., KOWALIK J., MASTALERZ P., SOROKA M., ŻOŃ J., *Tetrahedron Lett.* 3965 (1977).
- [108] HOFFMANN M., *Pol.J.Chem.* 52, 851 (1978).
- [109] KOLASA T., MILLER M.J., *J.Org.Chem.* 51, 3055 (1986).
- [110] KAFARSKI P., LEJCZAK B., SZEWCZYK J., *Can.J.Chem.* 61, 2425 (1983).
- [111] SOKOŁOWSKA T., BIERNAT J.F., *J.Chromatogr.* 13, 269 (1964).
- [112] ARENDT A., KOŁODZIEJCZYK A., SOKOŁOWSKA T., *Chromatographia* 9, 123 (1976).
- [113] SZEWCZYK J., LEJCZAK B., KAFARSKI P., *Experientia* 38, 983 (1982).
- [114] LEJCZAK B., KAFARSKI P., MASTALERZ P., *J.Chromatogr.* 324, 455 (1985).
- [115] WEBER E., *Kontakte (Darmstadt)* 26 (1984).
- [116] BEHR J.P., LEHN J.M., *J.Am.Chem.Soc.* 95, 6408 (1973).
- [117] MARUYAMA K., TSUKUBE H., *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 966 (1980).
- [118] NEWCOMB M., TONER J.L., HEGELSON R.C., CRAM D.J., *J.Am.Soc.* 101, 494 (1979).
- [119] TSUKABE H., *Tetrahedron Lett.* 22, 3981 (1981).
- [120] TSUKABE H., *Tetrahedron Lett.* 22, 1519 (1981).
- [121] MARUYAMA K., TSUKABE H., ARAKI T., *J.Am.Chem.Soc.* 104, 5197 (1982).
- [122] MARUYAMA K., TSUKABE H., ARAKI T., *Tetrahedron Lett.* 22, 2001 (1981).
- [123] TSUKABE H., *J.Polym.Sci.* 20, 2989 (1982).
- [124] YAMAGUCHI T., NISHIMURA K., SHINBO T., SUGIURA M., *Membrane* 10 178 (1985).
- [125] YAMAGUCHI T., NISHIMURA K., SHINBO T., SUGIURA H., *Chem.Lett.* 1542 (1985).
- [126] PLUCIŃSKI P., KAFARSKI P., LEJCZAK B., CICHOCKI M., *ISEC'86 International Solvent Extraction Conference, Monachium 1986, Preprints Vol. III*, 669 (1986).
- [127] KAFARSKI P., SKRZYPIŃSKI W., BRYJAK M., PLUCIŃSKI P., WIECZOREK P., *Peptide Chemistry 1987; T.Shiba, S.Sakakibara eds., Protein Research Foundation, Osaka 1988*, p. 717.

- [128] JOHNSON R.J., INOUE T., GOLDIN A., STARK G.R., *Cancer Res.* 36, 2720 (1976).
- [129] HOOGENRAAD N.J., *Archiv. Biochem. Biophys.* 188, 137 (1978).
- [130] HORI M., AOYAGI K., TATIBANA M., ISHIKAWA T., ISHI H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 900 (1977).
- [131] ONDETTI M.A., PETRILLO E.W. Jr., U.S. Pat. 4.151.172 (1979).
- [132] PETRILLO E.W. Jr., ONDETTI M.A., *Med.Res.Rev.* 2, 1 (1982).
- [133] SHUMYANTSEVA V.V., GANDURINA I.A., KHOMUTOV R.M., *Bioorg.Khim.* 12 470 (1986).
- [134] WEISS B., HUI K.S., BENUCK M., HUI M., BERG M.J., LAJTHA A., *Res. Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 52, 81 (1986).
- [135] WEISS B., HUI K.S., LAJTHA A., *Res.Comm.Chem.Pathol.Pharmacol.* 57, 351 (1987).
- [136] LESIAK K., STEC W.J., Symposium on Phosphorus Chemistry Directed Towards Biology, Burzenin 1979, s. 68.
- [137] KAFARSKI P., SOROKA M., *Synthesis* 219 (1982).
- [138] BAKUNIAK E., BAKUNIAK I., BORUCKA E., OSTROWSKI J., *J.Environ.Sci. Health* B18, 485 (1983).
- [139] DUŚ D., WOJDAT E., RADZIKOWSKI C., MASTALERZ P., *Arch.Immunol. Ther.Experiment.* 33, 325 (1985).
- [140] ARDALAN B., GLASER R.J., KENSLER T.W., JAYARAM H.N., TU V.P., McDONALD J.S., COONEY D.A., *Biochem.Pharmacol.* 8, 301 (1981).
- [141] WHITE J.C., HINES L.M., *Cancer Res.* 44, 507 (1984).
- [142] KAFARSKI P., LEJCZAK B., MASTALERZ P., DUŚ D., RADZIKOWSKI C., *J.Med.Chem.* 28, 1555 (1985).

Praca przyjęta do Redakcji
w kwietniu 1988 r.

PHOSPHONOPEPTIDES - SYNTHESIS AND STEREOCHEMISTRY

Various aspects of the preparation of the synthesis of phosphonopeptides containing P-terminal aminophosphonic acids are described. Aminophosphonic acids are the analogues of amino acids obtained by the replacement of COOH group of the former by PO_3H_2 moiety. Free, unesterified aminoalkylphosphonic acids are unsuitable for phosphonopeptide synthesis since the acylation of phosphonate anion competes with standard acylation. Resulting mixed anhydride usually undergoes hydrolysis yielding non-effective use of acylating agent. Much better results were obtained using diethyl esters of aminophosphonic acids. Studies of the influence of the reagents (amines, condensing agents and additives) and solvents used in reaction of N-protected amino acids with these esters by means of mixed anhydride method allowed the working-out of the general procedure for the synthesis. Using this procedure over 150 phosphonopeptides were synthesized. Also the procedure using diphenyl aminoal-

kylphosphonates as substrates appeared to be useful. In order to make this procedure useful the removal of diphenyl groups from phosphonate moiety was achieved by means of reaction with methanol, potassium fluoride and crown ether, followed the standard removal of phosphonate methyl esters by acidolysis. The preparation of diastereomers of these peptides was described. The simplest method seemed to be the use of enantiomers of diethyl 1-aminoalkylphosphonates. However, this procedure is limited by availability of these esters. In order to obtain optically active diphenyl 1-aminoalkylphosphonates these esters were resolved with dibenzoyl-L-tartaric anhydride. Resulting amides were easily converted into the corresponding imides which are structurally similar to phthalylamino acids. However, the use of standard procedures of the removal of amine-masking group failed and an approach for the synthesis of enantiomeric diphenyl 1-aminoalkylphosphonates was unsuccessful. On the other hand the use of dibenzoyl-L-tartaric anhydride appears to be one of the simplest routes to optically aminoalkylphosphonic acids. Diastereomeric phosphonodipeptides were obtained by separation of their mixtures by means of ion-exchange chromatography. Thus, using Dowex 50W X8 and elution of the peptides with water yielded chromatographically pure diastereomers. The method for the putative assignment of the configuration of P-terminal component of these peptides was proposed basing on the assumption that diastereomers differ in their relative mobilities in thin layer and ion-exchange chromatography. According to the general rule found for classical peptides the mobility of L-D isomer is bigger than the mobility of its L-L isomer. Finally the use of liquid emulsion membranes for the separation of diastereomeric phosphonopeptides was described. Also syntheses of N-phosphonoacetyl amino acids and N-phosphonoacetylaminophosphonates were presented.

ФОСФОНОПЕПТИДЫ - СИНТЕЗ И СТЕРЕОХИМИЯ

Описаны различные аспекты синтеза фосфонопептидов, содержащих P-конечные аминокислоты, т.е. такие аналоги, в которых остаток COOH был замещен группой PO_3H_2 . Свободные аминокислоты не являются хорошими субстратами в синтезе фосфонопептидов, ибо с желаемой реакцией ацилирования аминогруппы аминокислоты соперничает ацилирование фосфонатного аниона. Образующийся ангидрид обычно подвергается гидролизу, результатом чего является неэффективное потребление ацилирующего агента. Лучшие результаты дало употребление диэтиловых эфиров аминокислот. На основе исследований влияния употребленных реагентов (аминов, соединяющих агентов и добавлений) и растворителей на ход и эффективность синтеза фосфонопептидов предложена общая

процедура синтеза этих соединений при помощи смешанных ангидридов, образуемых из N-защитных аминокислот и этилового эфира хлормуравьиной кислоты. Этим методом получили около 150 фосфонопептидов. Ценным дополнением этого метода является способ, состоящий в употреблении дифениловых эфиров аминокислот в качестве субстратов. Это требовало разработки метода удаления фенольных остатков из фосфонной группы фосфонопептидов. Самые лучшие результаты получили трансэстрифицируя дифениловые фосфонаты при помощи смеси фтористого калия, метанола и краун эфира, а затем удаляя метиловую оболочку фосфонной группы посредством ацидолиза. Описаны также опыты получения диастереоизомерических фосфонодипептидов. Самым простым решением показалось применение энантимеров диэтиловых L-аминоалканосфосфонатов. Из-за трудностей в получении энантимеров этих эфиров этот метод применяют однако редко.

Следовательно предприняли опыты получения оптически активных дифениловых L-аминоалканосфосфонатов. Получаемые в реакции рацемических дифениловых аминокислот с дибензоил-L-винным ангидридом амиды легко разделяются на диастереоизомеры посредством кристаллизации. Эти амиды проводили в соответствующие имиды, которых строение похоже на строение фталилпроизводных. Несмотря на то не удалось получить оптически активных дифениловых эфиров. Употребление дибензоил-L-винного ангидрида для разделения дифениловых L-аминоалканосфосфонатов является однако одним из самых лучших методов получения энантимеров L-аминоалканосфосфонных кислот. Диастереоизомерические фосфонопептиды получили посредством разделения смеси изомеров (синтезируемых из рацемических диэтиловых или дифениловых эфиров) при помощи ионообменной хроматографии. Итак, вследствие употребления Довекса 50В X8 (Dowex 50W X8) и вымывания водой образовались хроматографически чистые диастереоизомеры. Было установлено, что конфигурацию R-терминального аминокислотного остатка в фосфонодипептиде можно определить при помощи относительной подвижности обоих диастереоизомеров в тонкослойной и ионообменной хроматографии. Согласно общепринятому принципу, обязывающему для классических пептидов, подвижность изомера L-D больше, чем подвижность изомера L-L. Описаны также опыты применения жидких эмульсионных мембран для разделения диастереоизомерических изомеров. Кроме этого описаны эффективные методы синтеза N-фосфоноацетилпроизводных аминокислот и аминокислотных кислот.

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	3
2. Synteza fosfonopeptydów za pomocą wolnych kwasów aminofosfonowych jako substratów	6
2.1. Konwersja kwasów aminoalkanofosfonowych w ich estry dietylowe	12
2.2. Zastosowanie estrów trimetylosililowych w syntezie fosfonopeptydów	16
3. Estry dialkylowe kwasów aminoalkanofosfonowych w syntezie fosfonopeptydów	18
3.1. Zastosowanie mieszanych bezwodników w syntezie fosfonopeptydów	21
3.1.1. Wpływ warunków reakcji acylowania aminofosfonianów dietylowych metodą mieszanych bezwodników na wydajność fosfonopeptydów	22
3.1.2. Ogólny przepis na otrzymywanie fosfonopeptydów metodą mieszanych bezwodników	25
3.1.3. Fosfonopeptydy zawierające P-terminalne fosfonowe analogi morfaktyln	31
4. Estry difenylowe kwasów aminoalkanofosfonowych w syntezie fosfonopeptydów	35
5. Otrzymywanie diastereomerycznych fosfonodipeptydów	38
5.1. Zastosowanie optycznie aktywnych estrów dietylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych w syntezie diastereomerycznych fosfonopeptydów	39
5.2. Próby otrzymania enancjomerów 1-aminoalkanofosfonianów difenylowych	40
5.3. Rozdział diastereomerycznych fosfonopeptydów za pomocą chromatografii jonowymiennej	46
5.4. Próby rozdziału diastereomerycznych fosfonodipeptydów za pomocą ciekłych membran emulsyjnych	49

6. Fosfonoacetyloaminokwasy i fosfonoacetyloaminofosfoniany . .	53
6.1. Synteza N-fosfonoacetyloaminokwasów	54
6.2. Synteza N-fosfonoacetyloaminofosfonianów	56
7. Literatura	59

CONTENS

1. Introduction	3
2. Synthesis of phosphonopeptides using free aminoalkylphosphonic acids as substrates	6
2.1. Conversion of free aminoalkylphosphonic acids into their diethyl esters	12
2.2. The use of trimethylsilyl esters in phosphonopeptide synthesis	16
3. Diethyl esters of aminoalkylphosphonic acids in phosphono-peptide synthesis	18
3.1. The use of mixed anhydride procedure in phosphonopeptide synthesis	21
3.1.1. The influence of the conditions of diethyl amino-alkylphosphonate acylation conditions on phosphono-peptide yields	22
3.1.2. General procedure for the synthesis of phosphono-peptides via mixed anhydrides	25
3.1.3. Phosphonopeptides containing P-terminal phosphonic analogues of morphactins	31
4. Diphenyl aminoalkylphosphonates in phosphonopeptide synthesis	35
5. Synthesis of diastereomeric phosphonodipeptides	38
5.1. The use of optically active diethyl aminoalkylphospho-nates in diastereomeric phosphonopeptide synthesis . . .	39
5.2. An approach for the synthesis of diphenyl 1-aminoalkyl-phosphonates	40
5.3. The separation of diastereomeric phosphonopeptides by means of ion-exchange chromatography	46
5.4. An approach for the separation of diastereomeric phospho-nodipeptides using liquid emulsion membranes	49
6. Phosphonoacetylamino acids and phosphonoacetylamino phospho-nates	53
6.1. Synthesis of N-(phosphonoacetyl)amino acids	54
6.2. Synthesis of N-(phosphonoacetyl)aminophosphonates . . .	56
7. References	59

PRACE NAUKOWE INSTYTUTU CHEMII ORGANICZNEJ I FIZYCZNEJ
(wydane w latach 1986—1988)

- Nr 29, Monografie nr 14, J. Oleksyszyn, *Amidoalkilowanie związków trójwartościowego fosforu*, Wrocław 1986 90,—
- Nr 30, Monografie nr 15, J. Skarżewski, *Kataliza międzyfazowa i micelarna w utlenianiu związków aromatycznych jonami metali*, Wrocław 1986 75,—
- Nr 31, Monografie nr 16, G. J. Ashwell, *The pyridinium 7,7,8,8-tetracyano-p-quinomethamide salts (from a low-temperature metal to a potential molecular rectifier)*, Wrocław 1986 50,—
- Nr 32, Monografie nr 17, M. Soroka, *Wybrane problemy chemii kwasów aminofosfonowych*, Wrocław 1987 140,—
- Nr 33, Konferencje nr 8, *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*, Wrocław 1988 1850,—
- Nr 34, Monografie nr 18, L. Syper, *Zastosowanie związków selenu w reakcjach utleniania cząsteczek organicznych*, Wrocław 1988 200,—
- Nr 35, Monografie nr 19, B. Lejczak, *Aktywność biologiczna aminofosfonianów i fosfonopeptydów*, Wrocław 1988 160,—

Cena zł 140,—

Subscription should be sent (at any time of the year) to:

„Ars Polona”

Krakowskie Przedmieście 7, 00-068 Warszawa
or OR PAN, 00-901 Warszawa, PKiN, POLAND

Bank account number: PKO BP XV Oddz. W-wa 1658-201045-139-11

Wydawnictwa Politechniki Wrocławskiej
ma stałe na składzie Księgarnia Wr 49
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
oraz Wojewódzka Księgarnia Techniczna
ul. Świdnicka 8, 50-067 Wrocław

ISSN 0324-9816