

C₃

INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ I FIZYCZNEJ
POLITECHNIKI WROCŁAWSKIEJ

Komunikat Nr 190

SYNTEZA PEPTYDÓW KWASÓW
AMINOFOSFONOWYCH

Paweł Kafarski

Słowa kluczowe: peptydy fosfonowe, fosfonopeptydy,
peptydy kwasów aminofosfonowych.

Kr 3484

W r o c ł a w 1977



3484

Na prawach rękopisu .

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

Mgr Paweł Kafarski

Praca doktorska /promotor: Doc.dr hab. P. Mastalerz/

Niniejszy komunikat wpłynął do Instytutu Chemii
Organicznej i Fizycznej w marcu 1977 r.

Promotorowi

Doc.dr habil.Przemysławowi Mastalerzowi
składam serdeczne podziękowanie
za wskazanie tematu,rady
i udzieloną mi pomoc

S P I S T R E Ś C I

	str.
ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	1
1.ROZPOWSZECHNIENIE ZWIĄZKÓW FOSFONOWYCH W PRZYRODZIE	3
1.1.Metody wykrywania związków fosfonowych w materiałach biologicznych	5
1.2.Rozpowszechnienie ciliatyny w przyrodzie	7
1.2.1.Ciliatyna w organizmie ludzkim	17
1.2.2.Kwas 2-aminoetylofosfonowy jako składnik białek	18
2.PEPTYDY FOSFONOWE	20
2.1.Ogólne rozważania strukturalne	20
2.2.Peptydy zawierające kwas aminofosfonowy jako składnik P-końcowy	21
2.3.Peptydy zawierające kwas aminofosfonowy jako składnik N-końcowy	26
2.4.Peptydy zawierające kwas aminofosfonowy w środku łańcucha peptydowego	27
2.5.Peptydy w których związane są ze sobą kwasy aminofosfonowe	28
2.6.Peptydy zawierające wiązanie C-P jako dodatkowy element budowy aminokwasu	30
2.7.Peptydy w których grupa aminowa zastąpiona jest fosfinową	31
2.8.Cele i problemy syntezy peptydów fosfonowych	32
3.BADANIA WŁASNE	34
3.1.Synteza P-terminalnych peptydów fosfonowych z wolnych kwasów aminofosfonowych	35
3.1.1.Otrzymywanie glicylociliatyny metodą Fischera	35
3.1.2.Acylowanie kwasów aminofosfonowych chlorkami ftaliloaminokwasów	36
3.1.3.Acylowanie kwasów aminofosfonowych estrami para- i orto- nitrofenylowymi N-zablokowanych aminokwasów	38
3.1.4.Synteza peptydów fosfonowych z wolnych aminokwasów metodą	

mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych	40
3.2. Synteza P-końcowych peptydów fosfonowych z estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych	41
3.2.1. Próby syntezy estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych	41
3.2.1.1. Próby syntezy estru dwuetylowego ciliatyny	42
3.2.1.2. Synteza chlorowodorków estrów dwuizopropylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych	44
3.2.1.3. Próby syntezy estrów dwualkilowych ciliatyny z wolnego aminokwasu	45
3.2.2. Próby syntezy peptydów fosfonowych metodą DGC	46
3.2.3. Synteza peptydów fosfonowych metodą mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych	49
3.3. Widma w podczerwieni ^1H i ^{13}C nmr otrzymanych peptydów	51
3.3.1. Widma w podczerwieni P-terminalnych peptydów fosfonowych	51
3.3.2. Widma protonowego rezonansu magnetycznego P-końcowych peptydów fosfonowych	53
3.3.3. Widma C-13 nmr peptydów ciliatyny	56
3.4. Próba hydrolizy kwasów N-acetyloaminoalkilofosfonowych pod wpływem acylazy nerkowej	57
4. OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI	59
5. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	63
5.1. Aparatura i stosowane metody analityczne	63
5.2. Synteza P-terminalnych peptydów fosfonowych z wolnych kwasów aminofosfonowych	65
5.2.1. Synteza kwasu 2-aminoetylofosfonowego	65
5.2.2. Synteza kwasów 1-aminoalkilofosfonowych	65
5.2.2.1. Synteza kwasów N-benzylo-1-aminoalkilofosfonowych	65
5.2.2.2. Synteza kwasów 1-aminoalkilofosfonowych	66
5.2.2.3. Synteza kwasu aminometylofosfonowego	67
5.2.3. Otrzymywanie glicylociliatyny metodą Fischera	67

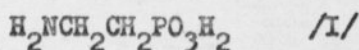
5.2.3.1. Synteza N-chloroacetylociliatyny	67
5.2.3.1.1. Acylowanie ciliatyny chlorkiem kwasu chlorooctowego	67
5.2.3.1.2. Acylowanie ciliatyny bezwodnikiem kwasu chlorooctowego	68
5.2.3.2. Amonoliza N-chloroacetylociliatyny, synteza glicylociliatyny	68
5.2.4. Acylowanie kwasów aminofosfonowych chlorkami ftaliloaminokwasów	68
5.2.4.1. Synteza ftaliloaminokwasów	68
5.2.4.2. Synteza chlorków ftaliloaminokwasów	69
5.2.4.3. Acylowanie kwasu 2-aminoetylofosfonowego chlorkami ftaliloaminokwasów	69
5.2.4.4. Acylowanie kwasu-1-amino-2-metylopropanofosfonowego chlorkiem ftaliloglicyny	70
5.2.4.5. Otrzymywanie peptydów ciliatyny przez hydrazynolizę ich N-ftalilowych pochodnych	70
5.2.5. Synteza P-końcowych peptydów fosfonowych metodą aktywnych estrów para- i orto-nitrofenylowych	71
5.2.5.1. Otrzymywanie estrów p- i o-nitrofenylowych ftaliloaminokwasów	71
5.2.5.2. Otrzymywanie estru p-nitrofenylowego karbobenzoksyglicyny	72
5.2.5.3. Acylowanie ciliatyny przy pomocy estrów p- i o-nitrofenylowych ftaliloaminokwasów	72
5.2.5.4. Acylowanie kwasu aminobenzylfosfonowego estrami orto- i para-nitrofenylowymi ftaliloaminokwasów	73
5.2.5.5. Acylowanie kwasów aminofosfonowych estrem p-nitrofenylowym karbobenzoksyglicyny	73
5.2.6. Synteza peptydów fosfonowych z wolnych kwasów aminofosfonowych metodą mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych	74
5.3. Synteza P-końcowych peptydów fosfonowych z estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych	76
5.3.1. Syntezy estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych	76
5.3.1.1. Synteza estrów dwualkilowych ciliatyny	76

5.3.1.1.1.Synteza cyjanometylofosfonianów dwualkilowych	76
5.3.1.1.2.Redukcja cyjanometylofosfonianów dwualkilowych metodą Isbella	77
5.3.1.1.3.Redukcja cyjanometylofosfonianu dwuetylowego na niklu Raneyu	77
5.3.1.2.Synteza chlorowodorków estrów dwuizopropylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych	78
5.3.1.2.1.Otrzymywanie N-benzyloalkiloaldehydów	78
5.3.1.2.2.Otrzymywanie chlorowodorków N-benzylo-1-aminoalkilofosfo- nianów dwuizopropylowych	78
5.3.1.2.3.Synteza chlorowodorków 1-aminoalkilofosfonianów dwuizo- propylowych	79
5.3.1.2.4.Otrzymywanie chlorowodorków aminobenzylofosfonianów dwualkilowych z hydrobenzamidu	80
5.3.1.3.Próby otrzymania dwualkilowych estrów ciliatyny z wolnego kwasu	81
5.3.1.3.1.Synteza ftalilociliatyny	81
5.3.1.3.2.Synteza estru monoetylowego ftalilociliatyny	82
5.3.1.3.3.Synteza estru monoetylowego ciliatyny	82
5.3.2.Próby syntezy peptydów fosfonowych metodą DCC	83
5.3.2.1.Synteza karbobenzoksyaminokwasów	83
5.3.2.2.Synteza P-końcowych peptydów kwasu aminobenzylofosfonowego z karbobenzoksyaminokwasów	84
5.3.2.3.Synteza P-końcowych peptydów kwasu aminobenzylofosfonowego z ftaliloaminokwasów	85
5.3.2.4.Próby syntezy P-końcowych peptydów ciliatyny i kwasu 1-amino- -2-metylopropanofosfonowego	86
5.3.3.Synteza peptydów fosfonowych metodą mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych	87
5.3.3.1.Synteza peptydów ciliatyny z karbobenzoksyaminokwasów	87
5.3.3.2.Synteza peptydów ciliatyny z ftaliloaminokwasów	88
5.3.3.3.Synteza estru dwuetylowego ftaliloaminokwasów	

5.3.3.4. Synteza peptydów kwasu aminobenzylfosfonowego	89
5.3.3.5. Synteza peptydów kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego	90
5.4. Próba hydrolizy kwasów N-acetylo-1-aminoalkilofosfonowych pod wpływem acylazy nerkowej	91
5.4.1. Acylowanie kwasów aminofosfonowych bezwodnikiem octowym	91
5.4.2. Próba hydrolizy kwasów N-acetylo-1-aminoalkilofosfonowych pod wpływem acylazy nerkowej	92
5.5. Spis tabel i tabele	92
6. LITERATURA CYTOWANA	100

Z A Ł O Ż E N I A I C E L P R A C Y .

Spośród związków fosfonowych występujących w przyrodzie kwas 2-aminoetylofosfonowy /ciliatyna - I/ jest najbardziej rozpowszechniony i występuje w największych ilościach.

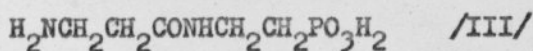
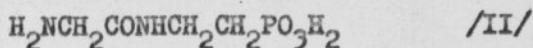


Jego występowanie w niektórych białkach zostało już dobrze udokumentowane, jednakże niewiele wiadomo o sposobie w jaki kwas ten jest związany w łańcuchu peptydowym. Jest bardzo prawdopodobne, że grupa aminowa ciliatyny bierze udział w wiązaniu peptydowym a co za tym idzie, że w przyrodzie istnieją peptydy zawierające P-końcowy kwas aminofosfonowy.

Ostateczne wyjaśnienie sposobu związania ciliatyny w łańcuchu peptydowym wymaga wydzielenia indywidualnych peptydów tego kwasu i określenia ich struktury. Do tego celu użyteczne będą syntetyczne peptydy kwasu 2-aminoetylofosfonowego jako wzorce do identyfikacji produktów naturalnych, oraz jako modele do badania własności takich peptydów.

Synteza peptydów zawierających kwasy aminofosfonowe jest zagadnieniem stosunkowo nowym i niezupełnie dotychczas rozwiązany. Problemowi temu poświęcona jest niewielka liczba prac, opublikowanych głównie w ostatnich dwóch latach, podających dość sprzeczne informacje na temat przydatności stosowanych metod tworzenia wiązania peptydowego oraz usuwania grupy estrowej blokującej resztę fosfonową.

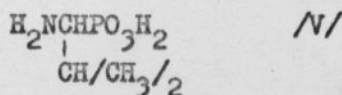
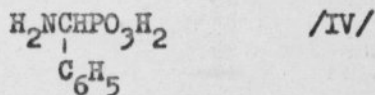
Opisano dotychczas zaledwie osiem całkowicie odblokowanych P-terminalnych peptydów kwasów aminofosfonowych w tym dwa peptydy kwasu 2-aminoetylofosfonowego, a mianowicie glicylociliatynę /II/ i β -alanylociliatynę /III/.



Ewentualne znaczenie biologiczne peptydów kwasu 2-aminoetylofosfonowego oraz brak satysfakcjonujących metod syntezy P-końcowych peptydów kwasów aminofosfonowych wydaje się być wystarczającym uzasadnieniem podjęcia syntezy tych połączeń.

Dodatkowym uzasadnieniem podjętych badań jest fakt, że opracowanie metod syntezy peptydów zawierających P-końcowe kwasy aminofosfonowe daje możliwość otrzymywania interesujących analogów naturalnych oligopeptydów o znanej aktywności biologicznej. Nie bez znaczenia jest też fakt, że uzyskane połączenia mogą być interesującymi środkami kompleksującymi jony metali.

Mając to na uwadze postanowiono przeprowadzić próby zaadaptowania najpopularniejszych, klasycznych metod syntezy peptydów celem otrzymania peptydów zawierających P-końcowy kwas aminofosfonowy. Wybrano kwasy: 2-aminoetylofosfonowy /I/, aminobenzylfosfonowy /IV/ oraz 1-amino-2-metylopropanofosfonowy /V/ jako substraty tych syntez.



Celem pracy było przeprowadzenie prób syntezy P-końcowych peptydów tych połączeń zarówno z wolnych kwasów aminofosfonowych jak też ich estrów dwualkilowych, porównanie efektywności zastosowanych metod syntezy peptydów i wskazanie najogólniejszych, najprostszych i najbardziej wydajnych spośród nich.

Otrzymane w ramach niniejszej pracy substancje zostaną także zbadane jako potencjalne substraty lub inhibitory peptydaz.

1. ROZPOWSZECHNIENIE ZWIĄZKÓW FOSFONOWYCH W PRZYRODZIE.

Wśród drobnocząsteczkowych składników żywej materii spotykany jest szereg połączeń zawierających elementy rzadko występujące w układach pochodzenia naturalnego.

Do tych niepospolitych elementów strukturalnych można zaliczyć wiązanie potrójne¹, grupę dwuazową w takich aminokwasach jak azaseryna czy 6-aza-5-oksonorleucyna², wiązania krzem-azot i krzem-tlen w związkach znalezionych w niektórych roślinach i niższych organizmach zwierzęcych³ czy wreszcie grupę nitrową⁴ i wiązanie węgiel-chlor⁵. Tego typu osobliwościami biochemicznymi są też odkryte stosunkowo niedawno połączenia zawierające wiązanie fosfor-węgiel. Znalezione dotychczas w przyrodzie związki fosfonowe zebrałem w tabeli 1

Stosunkowo szerokie rozpowszechnienie ciliatyny jak i fakt znajdowania nowych związków z wiązaniem C - P w przyrodzie ożywionej wskazuje na istotne biologiczne znaczenie tych połączeń.

Wydaje się też, że zarysowujący się schemat rozpowszechnienia związków fosfonowych w przyrodzie rzuca pewne światło na zagadnienie pochodzenia tych połączeń w żywych organizmach²⁰. Prawdopodobnie odegrały one znaczną rolę w okresie formowania się pierwszych form życia w pierwotnej atmosferze i oceanie. Procesy te przebiegały w atmosferze beztlenowej co stwarzało możliwość utworzenia się związków fosforu o niższym stopniu utlenienia a więc powstania wiązania C - P. Pogląd ten zdaje się popierać doświadczenie przeprowadzone przez Rabinowitza i wsp.²¹, którzy zaobserwowali powstanie kwasu 2-aminoetylofosfonowego podczas wyładowań elektrycznych prowadzonych w mieszaninie amoniaku, metanu, wody i fosfiny.

Pierwsze formy życia organizowały się zatem w kontakcie ze związkami fosfonowymi i dlatego wytworzyły się układy enzymatyczne niezbędne do ich przemian.

Tabela 1. Związki fosfonowe znalezione w przyrodzie żywej.

Nazwa zwyczajowa połączenia	Wzór	Organizmy, w których znaleziono związek	poz. literatury
Ciliatyna, 2-AEP	$H_2NCH_2CH_2PO_3H_2$	bakterie, pierwotniaki, jamochłony, mięczaki, szkarłupnie, stawonogi, obleńce, gąbki, wieloszczety, pierścienice, przeżuwacze, człowiek.	patrz pkt. 1.2.
N-metylowe pochodne	$CH_3NHCH_2CH_2PO_3H_2$ $/CH_3/2NCH_2CH_2PO_3H_2$ $/CH_3/3NCH_2CH_2PO_3H_2$	jamochłony, mięczaki, "Tetrahymena pyriformis", orzęski ze zwaczowcy	patrz pkt. 1.2.
β -fosfocalanina	$HOO\underset{\substack{ \\ NH_2}}{C}HCH_2PO_3H_2$	"Tetrahymena pyriformis", szereg jamochłonów	6 - 8
Kwas 1-hydroksy-2-aminoetylofosfonowy	$H_2NCH_2\underset{\substack{ \\ OH}}{C}HPO_3H_2$	"Acanthamoeba castellanii"	9 - 11
Fosfonomycyna	$CH_3-\underset{\substack{ \\ O}}{C}-CH-PO_3H_2$	"Streptomyces fradiae", "S. viridochromogenes", "S. wedmorensis"	12 - 13
Fosfinotricyna	$H_2N\underset{\substack{ \\ COOH}}{C}HCH_2CH_2-\underset{\substack{ \\ CH_3}}{P}/O//OH/$	"Streptomyces higroscopicus", "S. viridochromogenes"	14 - 19
Kwas 2-amino-5-fosfono-3-pentenowy	$H_2N\underset{\substack{ \\ COOH}}{C}HCH=CHCH_2PO_3H_2$	"Streptomyces plumbeus"	211

Warto też nadmienić, że fosfonomycyna^{12,13} i fosfotricyna¹⁴⁻¹⁹ są antybiotykami.

1.1. Metody wykrywania związków fosfonowych w materiałach biologicznych.

Badania nad występowaniem związków fosfonowych w przyrodzie utrudnia brak dobrej, bezpośredniej metody analitycznej pozwalającej na wykrycie wiązania C - P i określenie poziomu związków fosfonowych. Ze względu na różnorodność połączeń zawierających to wiązanie i ich skrajnie różne własności, opracowanie ogólnej metody opartej na właściwościach chemicznych wydaje się mało prawdopodobne.

Wiązanie C - P nie wykazuje charakterystycznej absorpcji w ultrafiolecie ani w zakresie widzialnym a spektroskopia w podczerwieni nie znajduje zastosowania do analizy złożonych mieszanin.

Poważne nadzieje rokuje zaproponowane już w 1965 roku przez Quina²² użycie magnetycznego rezonansu jądrowego. O ile zastosowanie protonowego nmr wydaje się być stosunkowo mało użyteczne ze względu na bardzo złożony charakter widma²³, to zastosowanie ³¹P nmr z akumulacją sygnału pozwala na łatwe stwierdzenie obecności wiązania C - P w badanym organizmie, a nawet określenie zawartości związków fosfonowych w stosunku do fosforanów²⁴⁻²⁶.

Znaczenie metody ogólnej, aczkolwiek o ograniczonym zastosowaniu, posiada metoda oparta na oznaczeniu fosforu po spaleniu próbki /fosfor całkowity/ i po wyczerpującej hydrolizie /fosfor estrowy/. Jeżeli wyniki tych dwóch oznaczeń różnią się w sposób istotny to badany materiał niewątpliwie zawiera odporne na hydrolizę związki fosfonowe. Warunkiem uzyskania prawidłowych wyników jest przeprowadzenie hydrolizy w sposób zapewniający rozkład estrów kwasu fosforowego. Według Quina²² wystarczająca jest hydroliza 6 N kwasem solnym w 105°C przez 48 godzin. Praktyczne znaczenie tej metody ogranicza jednak mała jej czułość. Biorąc pod uwagę osiągalną dokładność kolorymetrycznego oznacze-

nia fosforu można ocenić, że wykrycie związków fosfonowych nie jest możliwe, jeśli zawarty w nich fosfor stanowi mniej niż trzy procent fosforu całkowitego. Ponadto nie wszystkie związki fosfonowe są odporne na długotrwałą hydrolizę²⁴ i nie zawsze w warunkach podanych przez Quina otrzymuje się całkowity rozkład estrów kwasu fosforowego²⁴.

Ponieważ występujące w przyrodzie związki zawierające wiązanie C - P są przeważnie aminokwasami /tabela 1/, można dla ich wykrycia stosować metodę zaproponowaną przez Horiguchi²⁷. Próbkę poddaje się wyczerpującej hydrolizie a następnie frakcjonuje na kolumnie wypełnionej kationitem w celu usunięcia fosforanu nieorganicznego. Miara zawartości aminokwasów fosfonowych jest ilość fosforu zatrzymana na kolumnie przemytej wodą. Tą metodą można wykryć obecność związków fosfonowych nawet wtedy gdy zawarty w nich fosfor stanowi mniej niż 0,1% fosforu całkowitego²⁸. Materiał po usunięciu fosforanu nieorganicznego można analizować także przy pomocy analizatora aminokwasów identyfikując skład aminokwasowy oraz molową zawartość kwasów aminofosfonowych^{26,29-35}.

Alhadeff i Davies jr.^{35,36} użyli chromatografii gazowo-cieczowej do oznaczenia zawartości ciliatyny w różnych tkankach organizmu ludzkiego. Metoda ta jest jednak nieco niewygodna gdyż wymaga przeprowadzenia kwasu aminofosfonowego w lotną pochodną przez acylowanie grupy aminowej i estryfikację fosfonowej^{35,36} bądź też przez wyczerpujące silylowanie³⁷⁻³⁹.

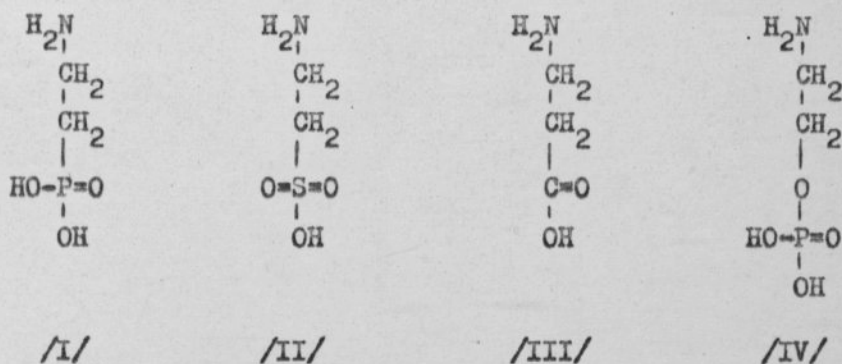
Dobre wyniki otrzymano również stosując kolorymetryczne oznaczanie kwasu 2-aminoetylofosfonowego w roztworze, z którego usunięto fosforany, używając fenolu i podchlorynu sodowego, dających barwną reakcję z ciliatyną⁴⁰.

Do wykrywania związków fosfonowych w organizmach żywych stosowano także chromatografię bibułową i cienkowarstwową oraz elektroforezę^{7,41-44}. Stosowano różne adsorbenty, eluenty oraz różne odczynniki służące do lokalizacji położenia związków fosfonowych.

1.2. Rozpowszechnienie ciliatyny w przyrodzie.

Pierwszy kwas aminofosfonowy w żywym organizmie znaleźli przypadkowo Horiguchi i Kandatsu ⁴⁵ zajmując się szczegółową analizą składu chemicznego pierwotniaków przewodu pokarmowego przeżuwaczy. Poddali oni hydrolizie surową frakcję lipidową mieszaniny pierwotniaków pobranych ze żwacza owcy i wyodrębnili oraz zidentyfikowali nowy aminokwas. Odkrywczy nazwali go ciliatyną aby podkreślić, że został on wykryty po raz pierwszy w pierwotniakach należących do gromady "Ciliatae" /orzęski/. Nazwa ta przyjęła się w literaturze chociaż szerzej stosowana jest nazwa chemiczna tego związku - kwas 2-aminoetylofosfonowy lub skrót: 2-AEP /od angielskiego 2-aminoethylphosphonic acid/.

Ciliatyna /I/ pod względem strukturalnym przypomina taurynę /II/ i β -alaninę /III/ a jednocześnie zbliżona jest budową do fosforanu kolaminy /IV/.



W organizmach żywych występuje ona głównie jako składnik lipidów /prze-glądowe pozycje literatury: 20, 46-57/ zwanych fosfonolipidami lub w formie niezwiązanej. Wykazano też, że jest ona składnikiem frakcji polisacharydowych ⁹⁻¹¹ i białkowych /patrz pkt. 1.2.2./.

Dalsze badania Horiguchi i Kandatsu ^{27, 58-61} dotyczyły rozpowszechnienia kwasów aminofosfonowych w szeregu organizmach jednokomórkowych /bakterie i pierwotniaki/ oraz wielokomórkowych /robaki obłe i ślimaki/. Podają oni, między innymi, że w bakteriach izolowanych ze żwacza owcy fosfor pochodzący

ze związków fosfonowych stanowi około 1% całkowitej zawartości fosforu. Późniejsze badania nie potwierdziły tej informacji - nie udało się stwierdzić obecności połączeń fosfonowych w bakteriach pochodzących ze żywca pasterożców, ale zostało potwierdzone ich występowanie w innych gatunkach bakterii. Zestawienie bakterii, w których znaleziono kwasy fosfonowe podaje tabela 2.

Tabela 2. Występowanie związków fosfonowych w bakteriach.

Nazwa bakterii	Fosfor P-C jako % fosforu całkowitego	pozycja literatury
Bakterie z paszy i wnętrzości zwierzęcych	nie oznaczono	62
<i>Bacillus subtilis</i>	0,15 - 0,17	27
<i>Escherichia coli</i>	0,06 - 0,07	27
<i>Agrob. tumefaciens</i>	0,41	27
<i>Corynthus facians</i>	0,21	27
<i>Clostridium butyricum</i>	0,29 - 0,40	27
<i>Bdellovibrio bacterioides</i> UK i 2	nie oznaczono	63
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,76/w lipidach/	64
<i>Mycobacterium 607</i>	1,30/w lipidach/	64
<i>Mycobacterium phlei</i>	2,10/w lipidach/	64

Wśród pierwotniaków, w których wykryto ciliatynę przeważają orzęski wydzielone ze żywca przeżuwaczy. "*Acanthamoeba castellanii*" i "*Tetrahymena pyriformis*" są jedynymi pierwotniakami, w których znaleziono związki fosfonowe, a które nie występują w przewodzie pokarmowym pasterożców. Oba te pierwotniaki odznaczają się stosunkowo wysoką zawartością połączeń z wiązaniem C - P. I tak trzecią część błon plazmy "*Acanthamoeba castellanii*" stanowi bogaty

w kwasy: 2-aminoetylofosfonowy i 1-hydroksy-2-aminoetylofosfonowy /występujące w równomolowej ilości/ polisacharyd. Zawartość fosforu związanego w formie C - P stanowi w tym polisacharydzie 70% fosforu całkowitego.

W "Tetrahymena pyriformis" fosfor związany z węglem może stanowić aż 15% fosforu całkowitego. Z tego też powodu pierwotniak ten stanowi bardzo wdzięczny obiekt badań nad zawartością związków fosfonowych w poszczególnych organelach⁶⁵⁻⁶⁸ a także form w jakich związki te występują. Z "Tetrahymena pyriformis" wydzielono kilka fosfolipidów^{24,67-76} i określono ich budowę chemiczną. Stwierdzono też występowanie kwasu 2-aminoetylofosfonowego we frakcjach proteinowych tego pierwotniaka. Występowanie kwasów fosfonowych w pierwotniakach podaje tabela 3.

Realizując program badań składu chemicznego jamochłonów morz południowych Kittredge i wsp.⁸³ stwierdzili nieoczekiwane znaczne ilości ciliatyny w ukwisle "Anthopleura elegantissima". Po tym odkryciu w pracowniach Kittredge^{7,81,84} oraz Quina⁸⁵⁻⁸⁷ podjęto systematyczne poszukiwania związków fosfonowych w jamochłonach. Stosując ekstrakcję tkanek 70% roztworem etanolu, wyczerpującą hydrolizę ekstraktu, chromatografię jonowymienną oraz chromatografię lub elektroforezę bibułową a także różnicowe oznaczenie ilości fosforu fosfonowego stwierdzono występowanie stosunkowo znacznych ilości związków z wiązaniem C - P w większości badanych jamochłonów, należących do różnych gromad. Już wstępna analiza chromatograficzna⁷ wykazała, że w badanych jamochłonach występuje obok kwasu 2-aminoetylofosfonowego jeszcze przynajmniej osiem innych związków fosfonowych, w tym pięć aminokwasów dających na chromatogramach typowe zabarwienie pod wpływem ninhydryny.

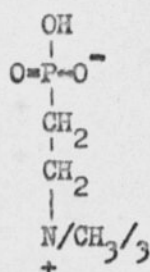
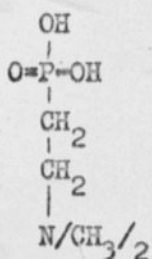
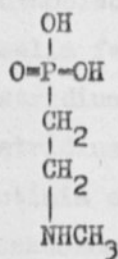
Rozważając możliwe drogi biosyntezy ciliatyny Kittredge i Hughes⁸¹ założyli, że ciliatyna może powstawać przez dekarboksylację kwasu 2-amino-3-fosfopropionowego / β -fosfocalanina/. Systematyczne poszukiwania tego kwasu w orga-

nizmach obfitujących w ciliatynę wykazały, że aminokwas ten jest dość szeroko rozpowszechniony w jamochłonach i orzęskach /patrz pkt.1./, ale zawartość jego jest niewielka i wynosi około 1 - 10% zawartości kwasu 2-aminoetylofosfonowego.

Tabela 3. Występowanie związków z wiązaniem C - P w pierwotniakach.

Nazwa gatunku	Fosfor C-P jako % fosforu całkowitego	2-AEP	N-metylowe pochodne 2-AEP	Wydzielono czyste lipidy	Pozycja literatury
Zooplankton za żwacza:					
owcy	3 - 5	+	+	+	8,27,42,77
krowy		+			78
kozy		+			28
<hr/>					
Orzęski /Ciliatae/					
<hr/>					
Mieszanina ze żwacza					
owcy	3 - 6,5	+	+		80,79,8,27,45,58
Eutodinium candatum		+		+	80
Paramecium K 32	0,82	+			27
Eutodinium sp.		+			79
Isotrichia sp.		+			79
Tetrahymena pyriformis	10 - 15	+	+	+	24,27,59,65-76,81,82
<hr/>					
Wiciowce /Nastigophora, Flagellata/					
<hr/>					
Euglena gracilis	0,1	+			27
Amphidium carteri		+	+		77
Peridinium trochoidem		+	+		77
Exuvella cassubica		+	+		77
Coccolithus huxlei		+	+		77
Syracosphaera elongata		+	+		77
<hr/>					
Zarodowce, Sarkodowce /Sarcodina/					
<hr/>					
Acanthamoeba castellanii		+			9 - 11
<hr/>					

Kittredge i współpracownicy⁸⁸ oraz Shelbourne i Quia⁸⁵ jako pierwsi zidentyfikowali trzy nowe kwasy aminofosfonowe w ukwiałach "*Anthopleura xanthogrammica*" i "*Metridium dianthus*". Są to N-metylowe pochodne ciliatyny:



Związki te występują w ukwiałach w dość znacznych ilościach. Na przykład z pięciu kilogramów "*Anthopleura xanthogrammica*" wydzielono 376 miligramów kwasu 2-aminoetylofosfonowego.

Badając fosfolipidy występujące w jamochłonach Karlsson i wsp.⁸⁹⁻⁹¹ wydzielili z ukwiału "*Metridium senile*" indywidualne fosfonolipidy i określili ich budowę chemiczną. Ceramido-2-aminoetylofosfonian został także wydzielony z "*Metridium dianthus*" przez Matsona⁹² oraz z "*Anthopleura elegantissima*" przez Rousera i wsp.^{93,94}. Z tych trzech organizmów wydzielono też glikoproteidy bogate w 2-AEP /patrz pkt. 1.6.6./

W jamochłonach zawartość połączeń z wiązaniem C - P jest zdumiewająco duża. I tak w ukwiale "*Tealia felina*" na 100 g suchej masy przypada 410 mg fosforu fosfonowego co stanowi około 50% fosforu całkowitego. Z innego ukwiału, "*Metridium dianthus*", wydzielono ciliatynę w ilości odpowiadającej aż 1% suchej masy tego organizmu.

Rozpowszechnienie kwasów fosfonowych w jamochłonach podaje tabela 4.

Tabela 4. Występowanie kwasów aminofosfonowych w jamochłonach.

Gatunek	2 2-AEP	N-metylowe pochodne 2-AEP	-fosfona alanina	pozycja literatury
1	2	3	4	5
<u>Koralowce /Anthozoa/</u>				
<i>Zoanthus sociatus</i>	+		+	7,81

1	2	3	4	5
<i>Anthopleura elegantissima</i>	+		ślady	7,83,84,93,94
<i>Anthopleura xanthogrammica</i>	+	+		7,85,88,95
<i>Anthopleura kurogane</i>	+			7
<i>Anthopleura pacifica</i>	+			7
<i>Tealia felina</i>	+		+	7,22,85,95
<i>Metridium senile</i>	+	+	+	7,29,84,89-92,95
<i>Metridium dianthus</i>	+	+	+	22,24,26,32,96,97
<i>Actinia equina</i>	+			85-86
<i>Bunadosoma cavernata</i>	+			24,85-86
<i>Bunadosoma sp</i>	+			25
<i>Aiptisia pallida</i>	+		+	46,85,86
<i>Leptogorgia virgulata</i>	+			46,48
<i>Paraotis rapiformis</i>	+			7,85,86
<i>Cerinthus americanus</i>	+			86
<i>Renilla reniformis</i>	+		+	86
<i>Renilla conikeri</i>	+		+	7
<i>Tubipora musica</i>	+		+	7
<i>Huricopsis flavida</i>	+		+	7
<i>Eucinea succinea</i>	+		+	7
<i>Briarum asbestianum</i>	+		ślady	7
<i>Acropora pulchra</i>	+			7
<i>Stylophora pistillata</i>	+			7
<i>Fungia fungitis</i>	+			7
<i>Favia speciosa</i>	+			7
<i>Microspicularia</i>	+			7
<i>Horenaltis</i>	+			7
<hr/>				
<u>Stułbiopławy /Hydrozoa/</u>				
<i>Tubularia crocea</i>	+			86
<i>Physalia physalis</i>	+			86
<i>Chlorohydra viridissima</i>	+			47
<hr/>				
<u>Krażkopławy /Scyphozoa/</u>				
<i>Dactylometra quinqueirra</i>	+			86
<i>Pelagia colorata</i>	+			7
<hr/>				
<u>Żebroplawy /Ctenophora/</u>				
<i>Mnemiopsis leidy</i>	+			87

Stosunkowo szeroko rozpowszechniona jest też ciliatyna w organizmach należących do różnych gromad typu "Mollusca". W niektórych przedstawicielach mięczaków zawartość połączeń z wiązaniem C - P jest bardzo wysoka. W ślimaku "Busyon canaliculatum" związki fosfonowe reprezentują około 30% fosforu całkowitego. Znaczne ilości związków fosfonowych występują w jadalnych małżach i ślimakach, między innymi w omózkach jadalnym^{22,96}, sżuchotce kalifornijskiej^{98,99} i ślimaku winniczku. W ślimaku winniczku fosfor w formie wiązania C - P stanowi około 5% fosforu całkowitego.

Badania mięczaków nie były tak szczegółowe jak jamochłonów i dotyczyły głównie występowania i określenia struktury fosfonolipidów w ślimakach, małżach i głowonogach. Mięczaki w których znaleziono związki fosfonowe i z których wydzielono indywidualne fosfonolipidy podaje tabela 5.

Tabela 5. Mięczaki w których znaleziono kwasy aminofosfonowe.

Nazwa gatunku	Wydzielono indywidualne fosfonolipidy	Fosfor P-C jako % fosforu całkowitego	pozycja literatury
1	2	3	4
<u>Małże /Lumellibranchia, Bivalvia/</u>			
<i>Mytilus edulis</i>	+	25	22,96,100
<i>Venus mercenaria</i>			22,95
<i>Crassostrea virginica</i>		30	25,86
<i>Corbicula sandai</i>	+		29,101-107
<i>Corbicula japonica</i>	+		101,104
<i>Corbicula leania</i>	+		29,104
<i>Unio bivalve</i>	+		101
<i>Inversidens hirasei</i>	+		101
<i>Anadonta lauta rostrata</i>	+		101,108
<i>Cristaria plicata</i>	+		101
<i>Pinctata martensi</i>	+		29,109
<i>Hyriopsis schlegii</i>	+		29,110-112

1	2	3	4
<i>Crassostrea gigas</i>	+		113
<i>Luciana radians</i>		7	100,114,115
<i>Ostrea gigas</i>	+	20	100,114,115
<i>Lymnea stagnalis</i>	+	7,5	115
<hr/>			
<u>Slimaki, Brzuchonogi /Gastropoda/</u>			
<i>Helix euhadra</i>			61
<i>Helix pomatia</i>			20
<i>Helix aspersa</i>			117
<i>Helix lactea</i>	+		118
<i>Haliotis midae</i>	+		98,99
<i>Haliotis gurneri</i>	+		29
<i>Haliotis corrugata</i>	+	0,3	119
<i>Busycon canaliculatum</i>		30	22,96
<i>Incillaria</i>			27
<i>Heterogen longispiria</i>	+		29,120
<i>Turbo coruntus</i>	+	10	29,100,102,107, 121-126
<i>Tegula orgyrostoma</i>	+		29
<i>Tegula pfeifferi</i>	+		29,107
<i>Tegula lisohlei</i>	+	33	100
<i>Morrodonta labio</i>	+		29,100,107
<i>Sinotaia histrica</i>	+		29
<i>Purpura bronni</i>	+		29
<i>Stomatella lyrata</i>	+		29,107
<i>Pugillina terratana</i>	+		29
<i>Batillaria multiformis</i>	+		29
<i>Semisulcospira benzoni</i>	+	29,107	—
<i>Lehmania ponieri</i>	+		117
<i>Limus flavus</i>	+		117
<i>Archidoris sp.</i>		20	46,86,87,117, 127
<i>Conomurex luhanus</i>	+	21	100
<i>Cellena eucosmia</i>	+	15	29,100
<i>Tapes japonica</i>	+		128
<i>Hinnites giganteum</i>	+	0,3	119
<i>Fascicolaria hunteria</i>			87
<i>Aphysia kurodai</i>			129

1	2	3	4
<u>Głównonogi /Cephalopoda/</u>			
Loligo edulis	+		29
Loligo pealei		10	86,87
Polypus vulgaris	+		29
<u>/Loricata/</u>			
Liolophira japonica		35	100

Systematycznych badań nad występowaniem związków fosfonowych w innych bezkręgowcach dotychczas nie przeprowadzono, choć połączenia te znaleziono w skorupiakach /tabela 6./, rozgwiazdach: "Asteroideas forbesi" ^{22,86,87} i "Astropecten articulatus" ⁸⁷, jeżowcu "Arbucia punctalata" ^{86,87} oraz robaku obłym "Panagrellus redivivus" ²⁷, gąbce "Hymenocidon heliophilia" ⁸⁶ i wieloszczecie "Chalopterus variopedatus" ^{86,87}. Na podstawie kilku zbadanych organizmów można sądzić, że skorupiaci słodkowodne i owady nie zawierają kwasów aminofosfonowych ^{127,130}.

Tabela 6. Związki w wiązaniu C - P znalezione w skorupiakach /Crustacea/.

Gatunek	związki z C-P w lipidach	związki z C-P w białkach	pozycja literatury
Amonyx nuxax	+	+	77
Cyclograpsus punctatus	+	+	98,127,130
Peneus duararum	+	+	86,87
Minippe sapidus	ślady		86,87

Jednymi z najbardziej interesujących wyników badań nad rozpowszechnieniem związków fosfonowych w przyrodzie jest ich znalezienie w tkankach organizmu ludzkiego, co omówiłem oddzielnie w punkcie 1.2.1., oraz w tkankach zwierząt przeżuwiających. Ciliatynę znaleziono w nerce, wątrobie, śledzionie i mleku

kozy^{2,6,7}. Najwięcej bo aż 75µg tego związku na gram tkanki występuje w wątrobie kozy. Poziom ciliatyny w mleku jest rzędu kilku mikrogramów na liter. Kwas 2-aminoetylofosfonowy wydzielono także z żółci, wątroby i mózgu wołowego^{97,131,212}. Z 28 kg mózgu wołowego Shimizu i wsp.⁹⁷ wydzielili 18 mg krystalicznego kwasu 2-aminoetylofosfonowego. Uwzględniając straty w procesie wydzielania oceniają oni iż poziom tego kwasu w mózgu wołowym jest 2 µg/g. Zarówno Shimizu⁹⁷ jak i Horiguchi i Kandatsu^{27,59} podkreślają, że zawartość ciliatyny w tkankach przeżuwaczy może być spowodowana jej przenikaniem z przewodu pokarmowego w następstwie strawienia pierwotniaków i bakterii obfitujących w ten aminokwas. Horiguchi⁵⁹ ocenia, że organizm krowy absorbuje 150 - 600 mg ciliatyny dziennie. W tkankach tego zwierzęcia musi zatem ustalać się pewien stały poziom kwasu 2-aminoetylofosfonowego wynikający ze stosunku szybkości wchłaniania oraz rozkładu i wydzielania.

Szansę rzucenia pewnego światła na rolę i znaczenie kwasu 2-aminoetylofosfonowego w tkankach kręgowców zdają się mieć prace nad absorpcją tego połączenia przez organizm szczura^{132-137,138}. Stwierdzono, że ciliatyna zostaje wbudowywana w lipidy tego organizmu^{134,137,138}, a nawet, że połączenie to jest prawdopodobnie syntetyzowane przez organizm szczura z nieorganicznego fosforanu będącego jedynym źródłem fosforu w podawanym pożywieniu¹³⁹. Autorzy jednak nie wykluczają udziału mikroorganizmów w syntezie tego kwasu.

Dalsze badania nad rozpowszechnieniem kwasów aminofosfonowych w przyrodzie będą zapewne zmierzały do ustalenia czy połączenia te są endogennymi składnikami kręgowców.

Interesującym i zupełnie prawie nie zbadanym jest zagadnienie występowania połączeń z wiązaniem C - P w świecie roślinnym. Znalezione kwasy aminofosfonowe w algach: "Monochrysis lutherii"¹⁴⁰, "Pseudochlorella aquatica"¹⁴¹ i "Astasia longa"¹⁴¹. Bardzo ważną jest podana przez Kittredge'a⁷⁷ informacja, że fitoplankton morski zawiera około 3% fosforu związanego w formie fosfonianowej. Jest to niezwykle istotne, gdyż plankton morski stanowi pożywienie większości organizmów morskich stojąc na początku łańcucha pokarmowego.

1.2.1. Ciliatyna w organizmie ludzkim.

Dane dotyczące występowania kwasu 2-aminoetylofosfonowego w organizmie ludzkim są kontrowersyjne.

Alhadeff i Davies jr. ^{35,36} znaleźli ciliatynę w szeregu tkankach człowieka. Wyniki ich badań zebrałem w tabeli 7.

Tabela 7. Rozpowszechnienie kwasu 2-aminoetylofosfonowego w poszczególnych tkankach organizmu ludzkiego.

Organ	zawartość ciliatyny we frakcji w mg/g mokrej tkanki			poz. lit.
	niepolarnych lipidów	polarnych lipidów	białkowej	
Mózg	0,4	0,1	1,0	35,36
wątroba	+	0,6	1,0	36
serce	+	+	+	36
mięśnie szkieletowe		+	+	36
aorta		+		142

Zaskakującym jest bardzo wysoki poziom tego kwasu w mózgu i wątrobie, a także znalezienie ciliatyny we frakcji lipidów niepolarnych. Z danych tych wynika, że mózgu ludzkim winno się znajdować 400 - 500 mg kwasu 2-aminoetylofosfonowego. Nie wydaje się prawdopodobne aby w tak dokładnie przebadanym organie jak mózg mogła się znajdować aż tak duża ilość tego kwasu niezauważona przez żadnego z uczonych badających skład aminokwasowy tej tkanki.

W sprzeczności z pracami Alhadeffa i Daviesa jr. stoi wcześniejsze doniesienie Simona i Rousera ¹¹⁹, którzy nie znaleźli ciliatyny we frakcjach lipidowych serca i mięśni szkieletowych człowieka.

Bishop i Alam ¹⁴² na zjeździe Amerykańskiego Towarzystwa Chemicznego zakomunikowali, że wykryli oni kwas 2-aminoetylofosfonowy w aorcie ludzi cierpiących na sklerozę, gdy nie występował on u ludzi zdrowych. Dane te nie zostały jednak później ujęte w formie publikacji.

Biorąc pod uwagę fakt, że zastosowana przez Alhadeffa i Daviesa jr. metoda nie jest jeszcze w pełni jednoznaczna ³⁴ wydaje się, że obecność kwasu 2-aminoetylofosfonowego w tkankach organizmu ludzkiego powinna być jeszcze potwierdzona osobnym eksperymentem.

1.2.2. Kwas 2-aminoetylofosfonowy jako składnik białek.

O występowaniu ciliatyny związanej w lipidach wiadomo sporo. W szeregu prac przeglądowych ^{20,46-57} zostało opisane jej rozpowszechnienie, rola i właściwości indywidualnych lipidów. Pomijam więc omówienie tego obszernego zagadnienia.

Bardzo niewiele wiadomo natomiast o występowaniu ciliatyny w białkach. Rosenberg ⁸² znalazł ten aminokwas w nierozpuszczalnej frakcji białkowej "Tetrahymena pyriformis", jednak trawienie enzymami proteolitycznymi nie doprowadziło do powstania rozpuszczalnych peptydów zawierających fosfor.

Bardziej systematyczne badania nad występowaniem kwasu 2-aminoetylofosfonowego we frakcjach białkowych rozpoczął Quin ^{22,46,86}, stwierdzając, że ciliatyna występuje w białkach licznych jamochłonów. W ukwiale "Metridium dianthus" znalazł on substancje białkowe zawierające 0,5% fosforu w formie wiązania C-P. Trawienie ich pepsyną daje rozpuszczalne polipeptydy, w których ciliatyna stanowi około 4%.

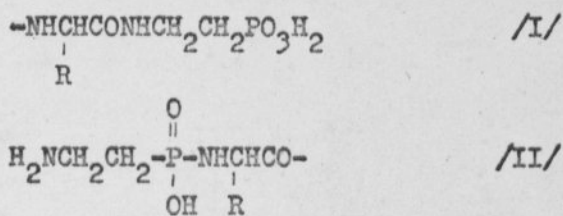
Późniejsze badania Bishopa i wsp. ^{30,95} oraz Hildebranda i wsp. ^{26,32} doprowadziły do wydzielenia z ukwiałów: "Metridium senile", "Metridium dianthus" oraz "Anthopleura xanthogrammica" frakcji glikoproteidów bogatych w fosfoniany. Autorzy określili też skład aminokwasowy i cukrowy wydzielonych białek.

W końcu Stevenson i wsp. ³¹ wydzieliли z "Metridium senile" dwie zasadowe proteazy, typu chymotrypsyny, zawierające odpowiednio 2 i 3% molowych kwasu 2-aminoetylofosfonowego. Są to, jak na razie, jedyne znane indywidualne białka zawierające ciliatynę. Obie proteazy oprócz aminokwasów zawierają także galaktosę i nie zawierają fosforu fosforanowego.

Występowanie kwasu 2-aminoetylofosfonowego w białkach można uznać zatem

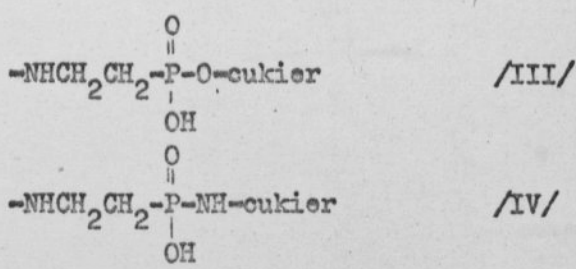
za dobrze udowodnione, jednak nie jest pewnym czy jest on składnikiem łańcucha peptydowego.

Z budowy ciliatyny wynikają dwie możliwości połączenia z łańcuchem peptydowym: przez wiązanie peptydowe między grupą karboksylową kwasu aminokarboksylowego a grupą aminową 2-AEP /I/ oraz poprzez wiązanie fosfonamidowe między grupą fosfonową a grupami aminowymi aminokwasów /II/. Gdyby ciliatyna występowała w środku łańcucha peptydowego to oba te wiązania musiałyby istnieć równocześnie.



Po reakcji rozpuszczalnych frakcji peptydowych zawierających kwas 2-aminoetylofosfonowy z dwinitrofluorobenzenem i hydrolizie próbki zarówno Quin²² jak też Kirkpatrick i Bishop⁹⁵ nie otrzymali DNP-ciliatyny co dowodzi, że w badanych peptydach grupa aminowa tego kwasu jest zablokowana. Nieobecność w tych peptydach kwasów tłuszczowych⁹⁵ sugeruje wiązanie tej grupy w białkach.

Bazując na wartościach punktu izoelektrycznego wydzielonych, bogatych w fosfony białek Bishop^{30,95} oraz Hildebrand³² twierdzą, że prawdopodobnie jedna grupa kwaśna ciliatyny jest wolna zaś druga związana z obecnym w białku cukrem, wiązaniem estrowym /III/ lub fosfonamidowym /IV/.



Jest prawdopodobne, że ciliatyna stanowi ogniwo łączące składnik białkowy z cukrowym w glikoproteidach.

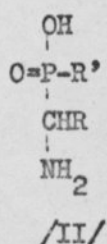
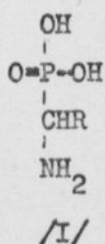
Ostateczne wyjaśnienie sposobu wiązania kwasu 2-aminoetylofosfonowego z łańcuchem peptydowym wymaga wyodrębnienia krótkich peptydów zawierających ten aminokwas.

2. PEPTYDY FOSFONOWE.

2.1. Ogólne rozważania strukturalne.

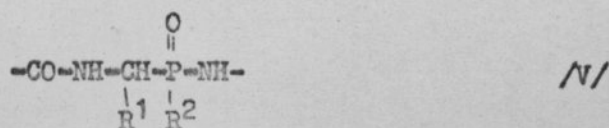
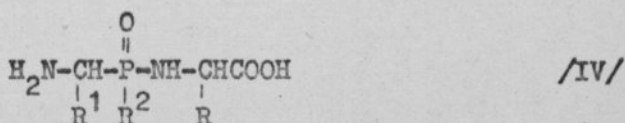
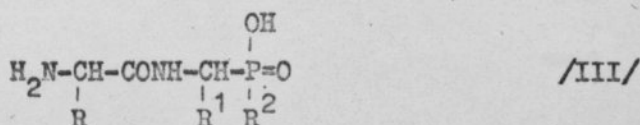
Peptydy w których jednym ze składników jest związek z wiązaniem C - P nazywamy fosfonowymi lub fosfonopeptydami ¹⁴³.

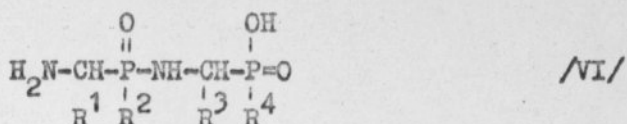
Wprowadzenie związku fosfonowego do cząsteczki peptydu stwarza szereg możliwości strukturalnych. Związkiem fosfonowym może tu być kwas aminofosfonowy /I/ lub aminofosfinowy /II/.



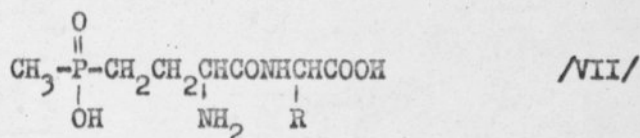
Ponadto w literaturze ¹⁴⁴ rozważano odległe analogi peptydów, którymi są kwasy karboksylowe mające grupę PH_2 w miejscu grupy aminowej.

Ze względu na położenie kwasu aminofosfonowego czy aminofosfinowego w łańcuchu peptydowym możemy je podzielić na P-końcowe /III/, N-końcowe /IV/, peptydy z kwasem aminofosfonowym w środku łańcucha /V/ a także peptydy składające się z kilku połączonych ze sobą kwasów aminofosfonowych /VI/.





Zupełnie oddzielną grupę stanowią peptydy w których grupa fosfonowa czy fosfinowa jest dodatkową resztą funkcyjną aminokwasu /np.VII/ oraz w których grupa PH_2 traktowana jest jako analog grupy NH_2 /VIII/.

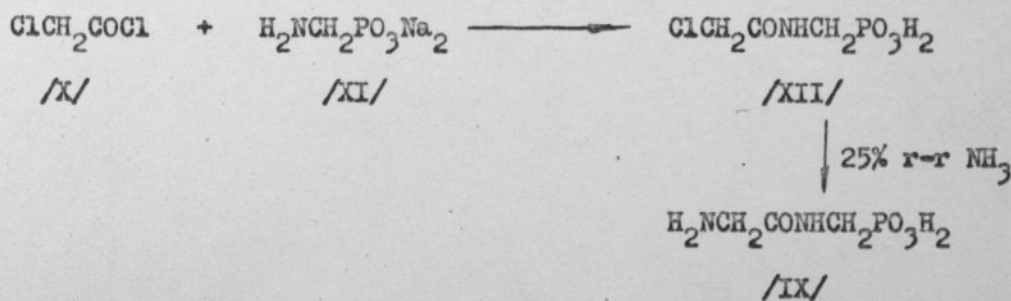


Celem otrzymania tych peptydów stosowano różne dość specyficzne metody syntezy dla każdej grupy związków.

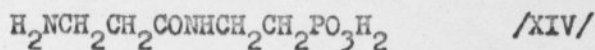
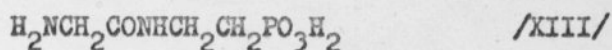
2.2. Peptydy zawierające kwas aminofosfonowy jako składnik P-końcowy.

Peptydy fosfonowe, w których kwas aminofosfonowy jest składnikiem P-końcowym stanowią grupę tych połączeń najszerszej opisanym w literaturze.

Pierwszy całkowicie odblokowany peptyd - kwas N-glicyloaminometylofosfonowy /IX/ otrzymali Neuzil i wsp. ¹⁴⁵ metodą Fischera, polegającą na acylowaniu soli sodowej kwasu aminometylofosfonowego /X/ chlorkiem kwasu chlorooctowego /XI/ w wodzie, a następnie wymianę chloru w otrzymanym kwasie N-chloroacetyloaminometylofosfonowym /XII/ na grupę aminową w wodnym roztworze amoniaku.

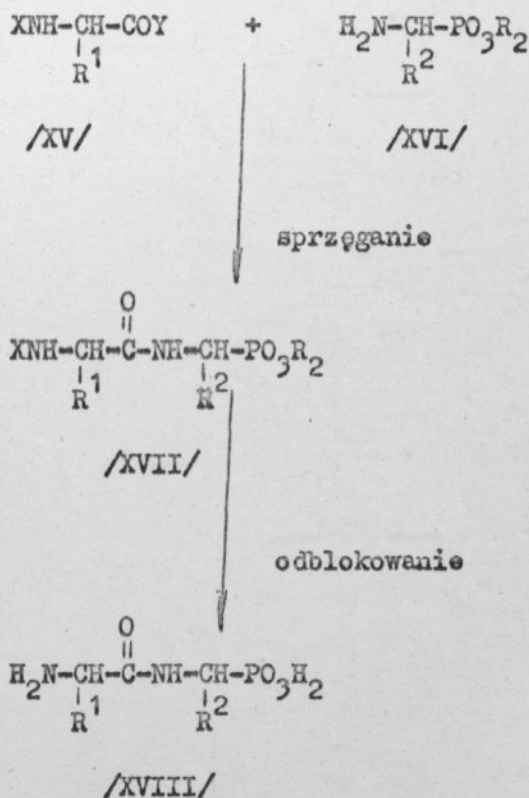


W identyczny sposób otrzymano jedyne dotychczas opisane peptydy kwasu 2-amino-etylofosfonowego a mianowicie glicylociliatynę /XIII/ i β -alanylociliatynę /XIV/ 146, 147 .



Metoda ta nie pozwala jednak na otrzymanie dowolnych pochodnych a wydajności tej reakcji są niewielkie.

W celu otrzymania peptydów fosfonowych z P-końcowym kwasem aminofosfonowym zaadaptowano szereg klasycznych metod syntezy peptydów. Ogólny tok postępowania oraz zestawienie opisanych w literaturze peptydów przedstawia schemat:





gdzie: $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5, \text{Na}, \text{Mg}$

$\text{R}^1 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

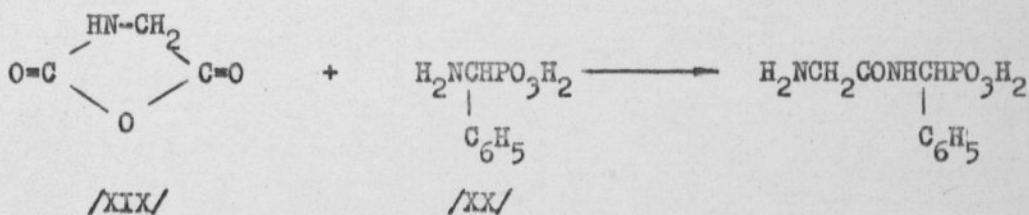
$\text{R}^2 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_6\text{H}_5$

Mimo, że w chemii peptydów jest znanych ponad sto grup blokujących i ponad pięćdziesiąt metod sprzęgania aminokwasów, to liczba zastosowanych grup chroniących jak i liczba metod sprzęgania zastosowana w tym przypadku jest niesłychanie uboga i ogranicza się tylko do kilku najbardziej popularnych. Żadna z zaproponowanych metod syntezy P-końcowych peptydów fosfonowych nie pozwala w prosty sposób otrzymać dowolnego peptydu z dowolnie wybranego kwasu aminofosfonowego.


Próby otrzymywania tych połączeń prowadzono wykorzystując bądź wodne roztwory soli kwasów aminofosfonowych /XVI, R=Na, Mg/ bądź też estry etylowe tych kwasów /XVI, R=C₂H₅/. Estry te są łatwo hydrolizowane przez 40% roztwór bromowodoru w lodowatym kwasie octowym co pozwala otrzymywać odblokowane fosfono-peptydy.

Sole kwasów aminofosfonowych acylowano stosując chlorki /XV, Y=Cl/ 148-150 lub mieszane bezwodniki karbonylowo - karbonowe /XV, Y=OCOOC₂H₅/ 143, 146 ftalilo /XV, X=/ 143, 146, 148-150 lub tozyloaminokwasów /XV, X=CH₃--SO₂/.

Gilmore i wsp.¹⁴⁹ opisali próbę zastosowania N-karboksybezwodnika glicyny /XIX/ do acylowania kwasu aminobenzylfosfonowego /XX/:



Otrzymany z wydajnością 33% produkt jest trudny do wydzielenia z mieszaniny poreakcyjnej.

Większe możliwości otrzymywania peptydów fosfonowych z wolnych kwasów aminofosfonowych zdaje się rokować metoda aktywnych estrów opisana w niemieckim doniesieniu patentowym¹⁵¹. Użyto tu N-zablokowanych kwasów aminokarboksylowych zestryfikowanych N-hydroksyimidem kwasu bursztynowego /XV, Y=/.

Ogólniejszymi i bardziej zadawalającymi okazały się metody, w których wykorzystywano estry dwuetylowe kwasów aminofosfonowych /XVI, R=C₂H₅/.

Grupę aminową kwasu aminokarboksylowego blokowano zazwyczaj resztą benzyloksy-

karbonową /XV, X=C₆H₅CH₂OCO-/ 149, 152-156 lub rzadziej ftalilową 157, 158.

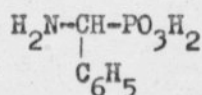
W jednym przypadku użyto grupy t-butoksylokarbonowej /XV, X=CH₃/₃COCO-/ 159.

Wiązanie peptydowe otrzymywano stosując mieszane bezwodniki karboksylowo-karbonowe 152-154, 159 lub dwucykloheksylokarboodwuimid /DCC/ 149, 155-157

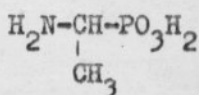
jako czynnik sprzęgający. Gilmore i McBride ¹⁴⁹ opisali też użycie 1-etoksykarbonylo-2-etoksy-1,2-dwuhydrochinoliny /ENDQ/.

Najogólniejszymi wydają się być w tym przypadku metoda mieszanych bezwodników oraz metoda, w której użyto DCC. Metoda mieszanych bezwodników zastosowana została po raz pierwszy już w 1963 roku przez Poroszina i Buriczenkę 152-154, w pierwszych pracach na temat syntezy peptydów fosfonowych.

Otrzymywanie peptydów fosfonowych z estrów dwuetylowych kwasów aminofosfonowych jest poważnie ograniczone przez trudną dostępność tych estrów. Metodami tymi otrzymano jedynie peptydy kwasu aminobenzylfosfonowego /XXI/ oraz jeden peptyd kwasu 1-aminoetylofosfonowego /XXII/.



/XXI/



/XXII/

Wydaje się, że znalezienie prostej metody blokowania reszty fosfonowej kwasu aminofosfonowego winno rozwiązać ten problem. Niestety brak jest dotychczas ogólnej, bezpośredniej metody estryfikacji tych kwasów.

Mimo stosunkowo sporej liczby prac na temat otrzymywania P-końcowych peptydów fosfonowych i dużej liczby N-zablokowanych i P,N-zablokowanych połączeń otrzymano niewiele pochodnych z wolnymi grupami aminową i fosfonową /XVIII/. Opisane dotychczas takie peptydy fosfonowe zebrałem w tabeli 7.

Tabela 7. Całkowicie odblokowane peptydy z P-końcowym kwasem aminofosfonowym.

Wzór połączenia	Metoda otrzymywania	Wydajność ^x	Pozycja literatury
<u>Peptydy otrzymane z soli kwasów aminofosfonowych</u>			
$H_2NCH_2CONHCH_2PO_3H_2$	metodą Fischera	20%	145-147
	przez chlorek ftaliloglicyny	20%	143
	met. mieszanych bezwodników	50%	143, 146, 147
$H_2NCH_2CH_2CONHCH_2PO_3H_2$	metodą Fischera	20%	146, 147
$H_2NCH_2CONHCH_2CH_2PO_3H_2$	metodą Fischera	20%	146, 147
	przez chlorek ftaliloglicyny	20%	143
	metodą mieszanych bezwodników	50%	143, 146, 147
$H_2NCH_2CH_2CONHCH_2CH_2PO_3H_2$	metodą Fischera	20%	146, 147
$H_2NCH_2CONHCH(CH_3)PO_3H_2$	metodą mieszanych bezwodników	50%	143
$H_2NCH(C_6H_5)PO_3H_2$	przez chlorek ftaliloglicyny	75%	149
	z N-karboksybezwodnika glicyny	33%	149
<u>Peptydy otrzymane z estrów dwuetylowych kwasów aminofosfonowych</u>			
$H_2NCH(CH_3)CONHCH(CH_3)PO_3H_2$	metodą DCC	70%	155, 156
$H_2NCH_2CONHCH(C_6H_5)PO_3H_2$	metodą DCC	70%	149
	metodą ENDQ	70%	149
$H_2NCH(CH_3)CONHCH(C_6H_5)PO_3H_2$	metodą DCC	nie podano	158

^xWydajności podałem dla końcowego produktu licząc je w stosunku do wyjściowego kwasu aminofosfonowego lub jego estru.

Prócz syntezy P-końcowych peptydów fosfonowych opisano szczegółowo widna w podczernieni ^{146,160}, własności chromatograficzne ¹⁴⁷ oraz strukturę określoną metodami rentgenograficznymi ^{146,160} niektórych z nich /pochodne glicyny i β-alaniny/.

Bardzo ciekawymi są prace Neuzila i wsp. ^{161,162} traktujące o mechanizmie degradacji N-glicylo- i N-β-alanylociliatyny przez "Pseudomonas aureginosa".

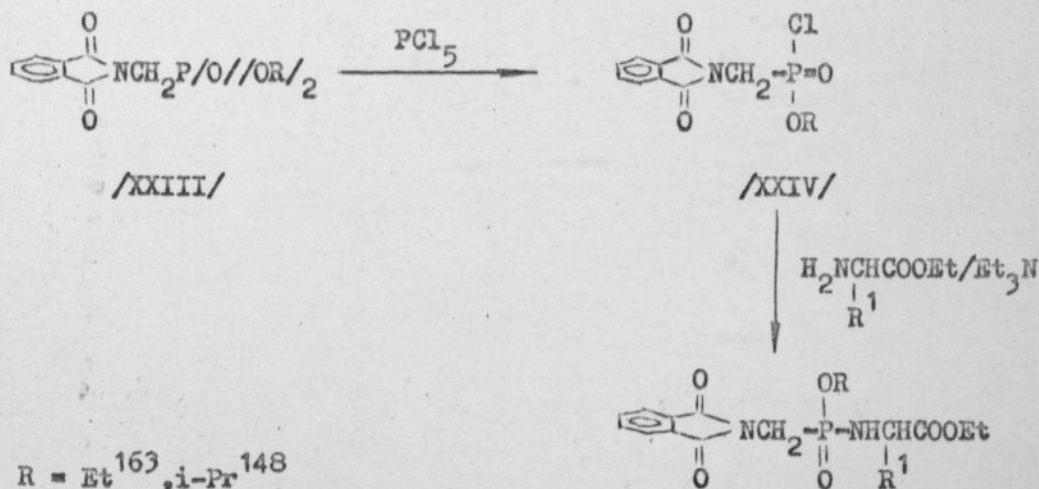
Atherton i wsp. ¹⁵¹ w doniesieniu patentowym stwierdzają, że otrzymane przez nich peptydy mają własności przeciwbakteryjne.

Wydaje się, że problemy syntezy fosfopeptydów z P-końcowym kwasem aminofosfonowym nie zostały jeszcze w pełni rozwiązane i wymagają dalszych badań koncentrujących się na znalezieniu prostych metod estryfikacji kwasów aminofosfonowych, dobrych metod sprzęgania i najodpowiedniejszych grup chroniących.

2.3. Peptydy zawierające kwas aminofosfonowy jako składnik N-końcowy.

Syntezę peptydów zawierających N-końcowy kwas aminofosfonowy opisali Yamachi i wsp. ¹⁶³. Tę samą metodę zastosowali też później Hariharan i wsp. ¹⁴⁸.

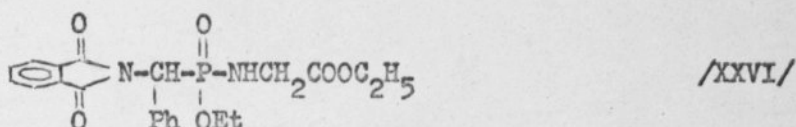
Obrazuje ją schemat:



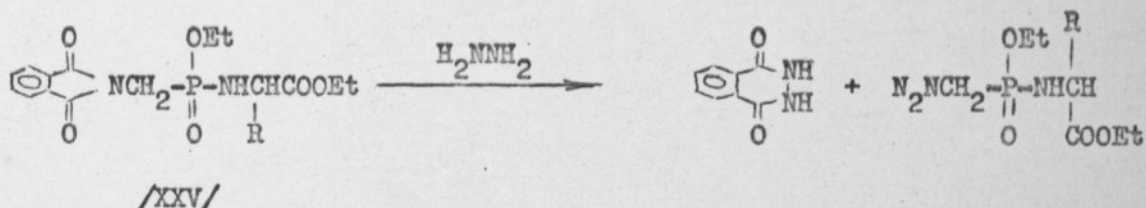
gdzie: R = Et ¹⁶³, i-Pr ¹⁴⁸

R¹ = H ^{148,163}, CH₃ ¹⁶³, CH₂C₆H₅ ¹⁶³,

Ftaliloaminometylofosfonian dwualkilowy /XXIII/ traktowano równomolową ilością pięciochlorku fosforu w benzenie otrzymując w rezultacie monochlorek /XXIV/. Monochlorkiem tym fosforylowano estry etylowe kwasów aminokarboksylowych otrzymując dwupeptydy /XXV/, których reszta aminowa była zablokowana ftalilem a reszty karboksylowa i fosfonowa grupami estrowymi. W identyczny sposób otrzymano peptyd kwasu aminobenzylfosfonowego i glicyny /XXVI/ ¹⁶³.



Yamauchi i wsp. ¹⁶³ opisali też usunięcie grupy chroniącej resztę aminową w reakcji hydrazynolizy:

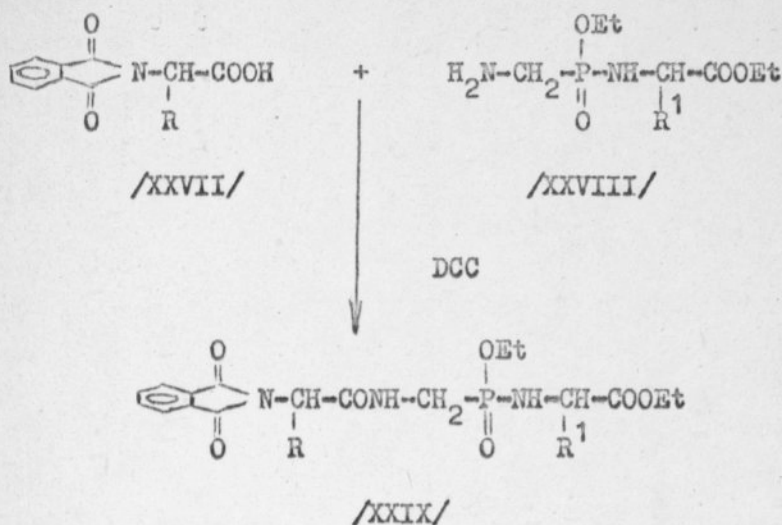


Otrzymane w ten sposób peptydy fosfonowe nie zostały wydzielone ani scharakteryzowane, ale używano ich w stanie surowym jako substratów dalszych reakcji /patrz pkt. 2.4. i 2.5./.

Synteza peptydów zawierających N-końcowy kwas aminofosfonowy jest zagadnieniem niezwykle interesującym i praktycznie zupełnie nierozwiązanym. Wydaje się, że próby zastosowania metod tworzenia wiązania P - N przeniesionych z chemii nukleotydów mogą dać obiecujące wyniki.

2.4. Peptydy zawierające kwas aminofosfonowy w środku łańcucha peptydowego.

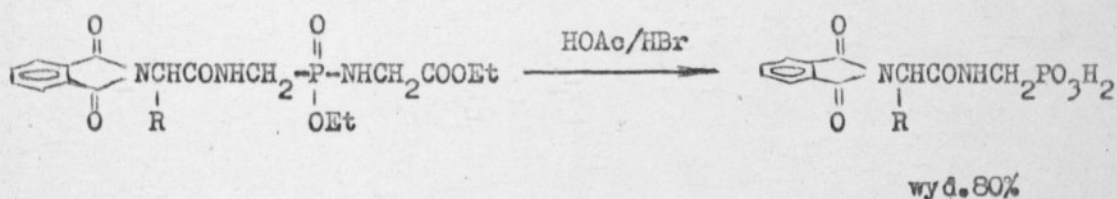
Yamauchi i wsp. ¹⁶³ otrzymali trzy całkowicie zablokowane peptydy, zawierające kwas aminofosfonowy w środku łańcucha peptydowego. Sprzęgali oni ftaliloaminokwasy /XXVII/ z dwupeptydami zawierającymi N-końcowy kwas aminofosfonowy /XXVIII/, używając DCC. W ten sposób otrzymali oni żądane produkty /XXIX/ z wydajnościami 70 - 75%.



gdzie: $\text{R} = \text{H}, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

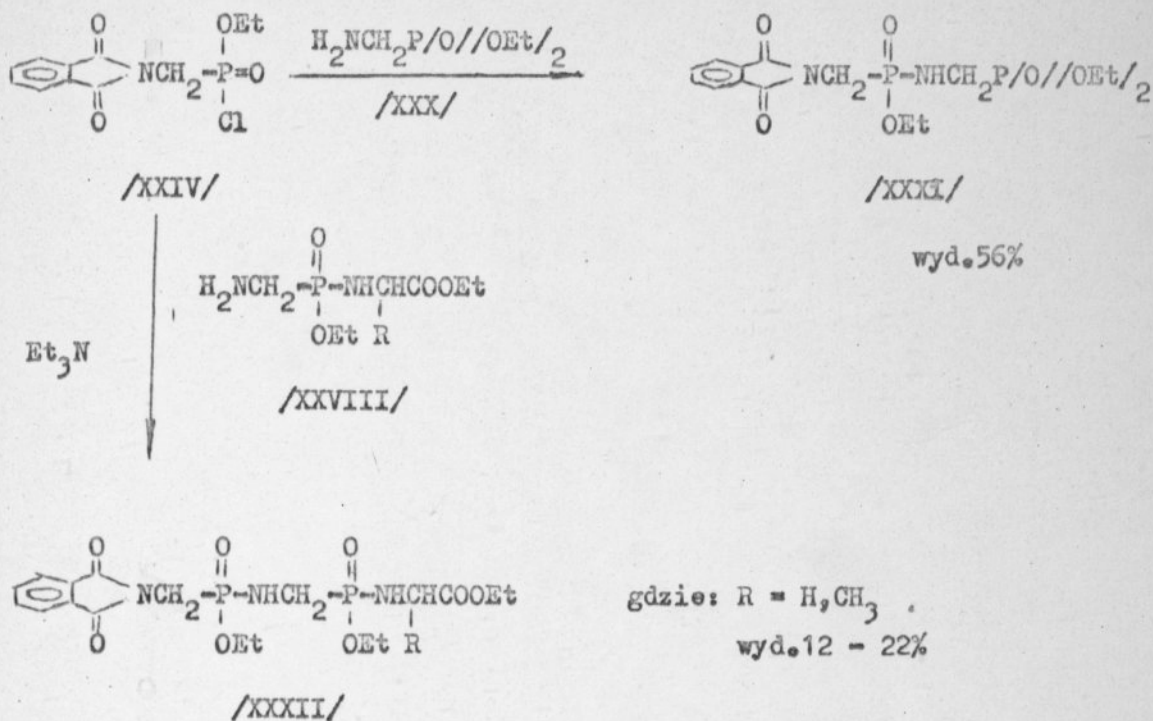
$\text{R}^1 = \text{H}, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

Próby usunięcia reszt estrowych i uzyskania w ten sposób wolnych peptydów prowadziły do zerwania wiązania P-amidowego i otrzymania peptydów zawierających P-końcowy kwas aminofosfonowy.

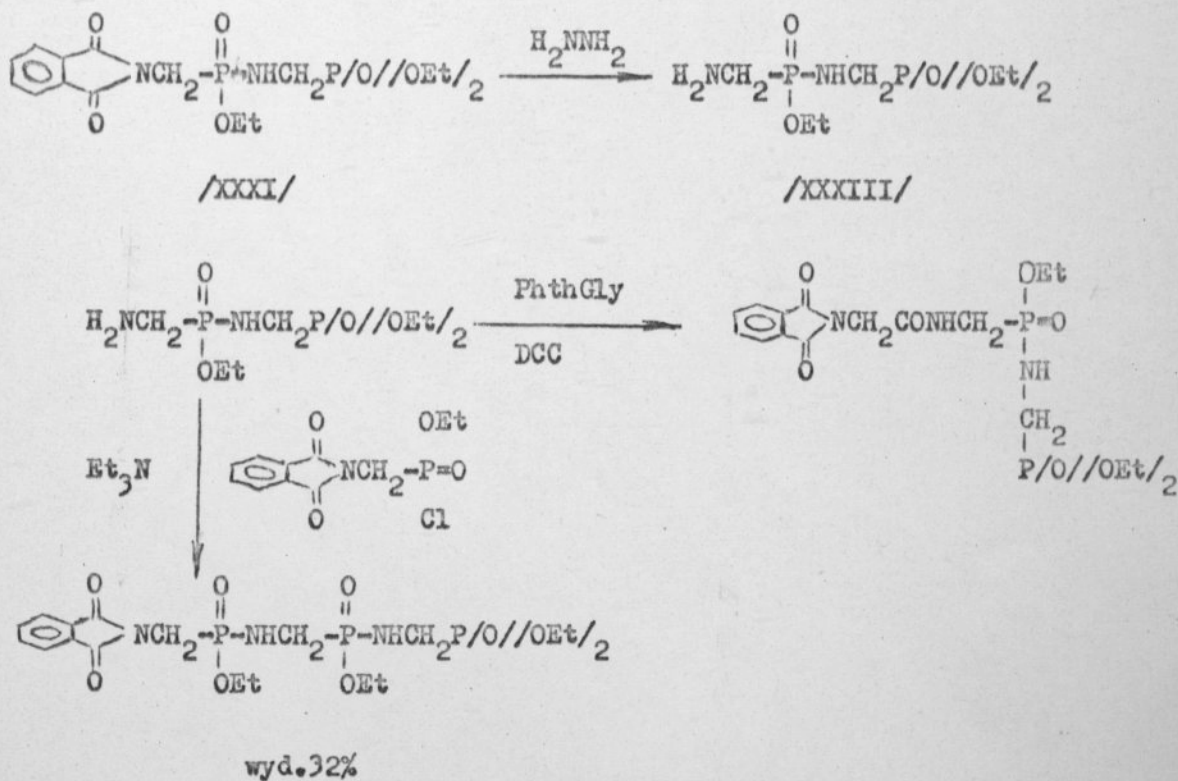


2.5. Peptydy w których związane są ze sobą kwasy aminofosfonowe.

Peptydy takie otrzymali także Yamauchi i wsp.¹⁶⁴ Syntezowali je oni podobnie jak peptydy zawierające N-końcowy kwas aminofosfonowy, to jest fosforylując aminometylofosfonian dwuetylowy lub N-odblokowane peptydy zawierające N-końcowy kwas aminofosfonowy /XXVIII/ chlorkiem ftalilometylofosfonianu etylowego /XXIV/:

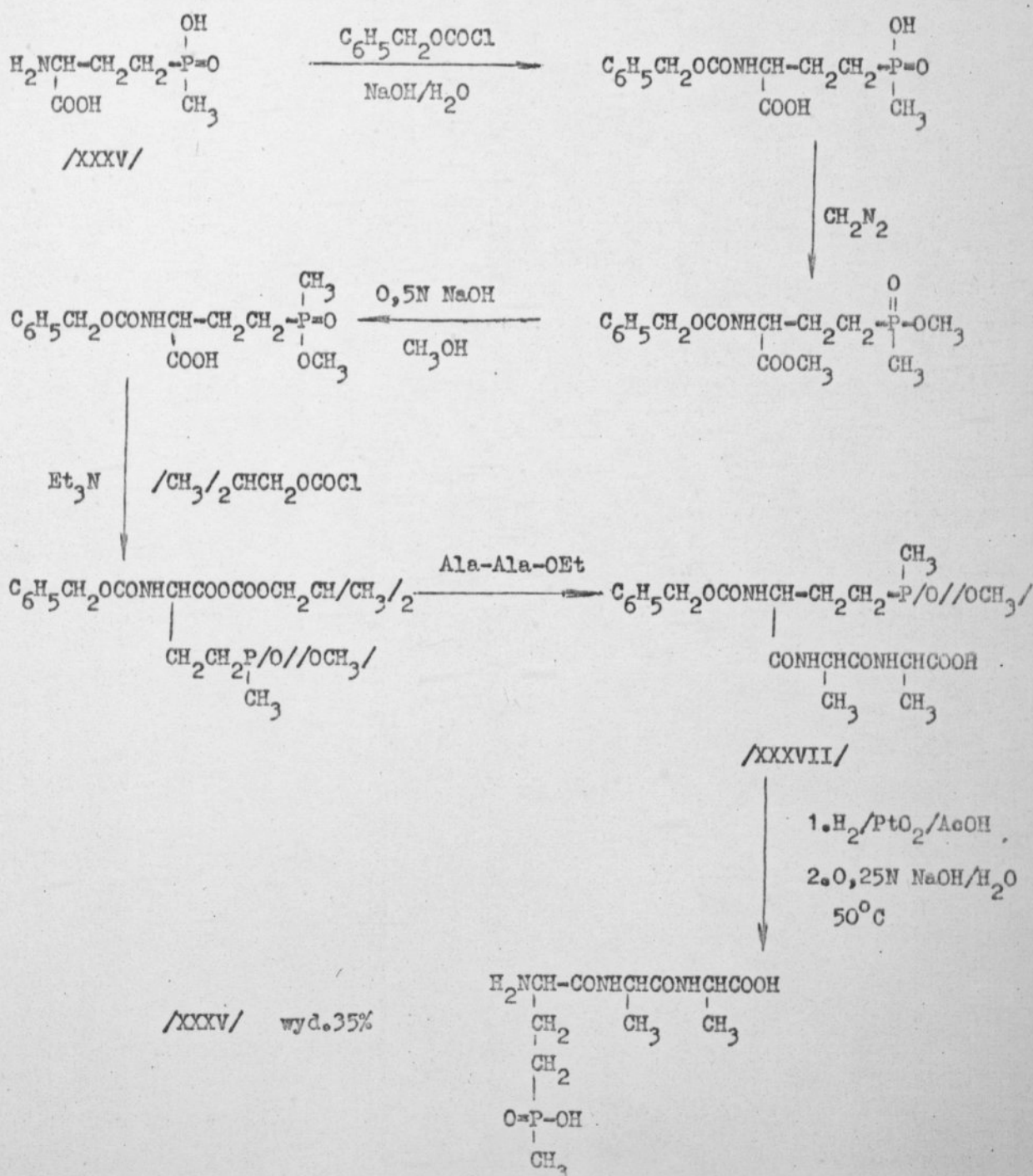


Odblokowanie grupy aminowej w otrzymanym dipeptydzie /XXXII/ w reakcji hydrazynolizy prowadzi do połączenia /XXXIII/. Związku tego nie wydzielano lecz od razu fosforylowano chlorkiem ftaliloaminometylofosfonianu etylowego /XXIV/ lub acylowano ftaliloglicyną używając DCC.



2.6. Peptydy zawierające wiązanie C-P jako dodatkowy element budowy aminokwasu.

Znalezienie w "Streptomyces" nowego antybiotyku - fosfinitricylo-l-alanylo-l-alaniny /XXXV/ ¹⁴⁻¹⁹ spowodowało konieczność opracowania metody syntezy tego połączenia. W celu określenia roli reszty l-alanylo-l-alaniny w antybiotyku Niida i wsp. ¹⁶⁵ zsyntezowali taki trójpeptyd używając wydzielonej ze "Streptomyces" fosfinitricyny /XXXVI/ i estru etylowego d,l-alanylo-d,l-alaniny. Reakcje prowadzące do żądanego produktu przedstawia schemat:



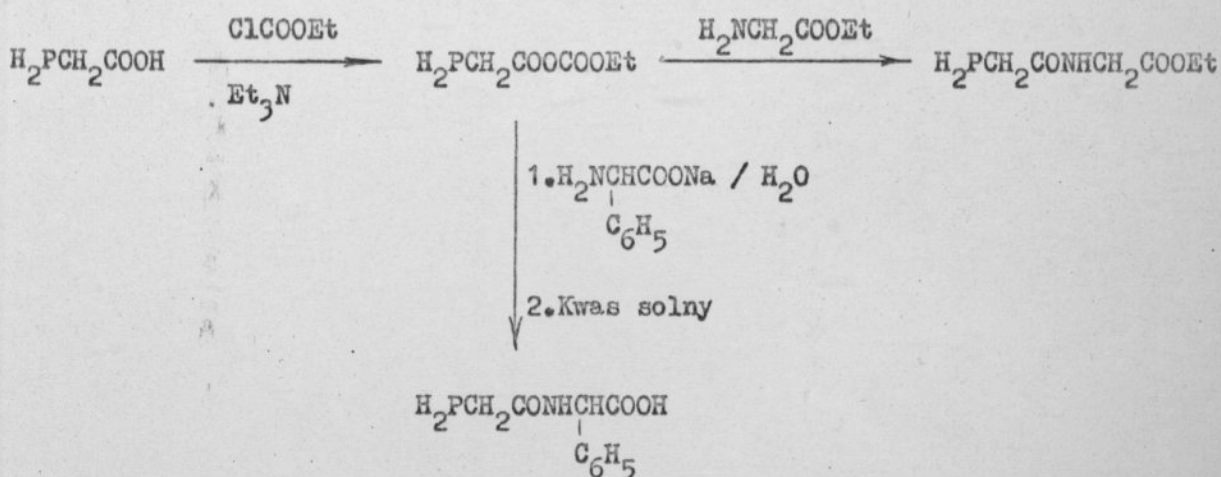
Po zablokowaniu grupy aminowej fosfinotricyny /XXXVI/ resztą benzyloksykarbonową a następnie grup karboksylowej i fosfinowej resztami estrowymi selektywnie mydlano ester karboksylowy ogrzewając produkt w 0,5N roztworze wodorotlenku sodowego w metanolu. Wykorzystując metodę mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych uzyskiwano wiązanie peptydowe otrzymując trójpeptyd /XXXVII/. Po usunięciu z niego grup chroniących otrzymano fosfinotricylo-d,l-alanylo-d,l-alaninę /XXXV/.

Okazało się, że aktywność otrzymanego produktu stanowi zaledwie 10-15% aktywności trójpeptydu wydzielonego ze "Streptomyces", zawierającego resztę l-alanylo-l-alaninową.

Dalsze badania zdają się świadczyć, że reszta ta ma za zadanie umożliwić transport antybiotyku /fosfinotricyny/ przez błony komórkowe.

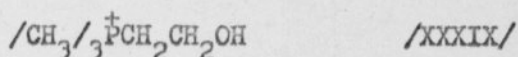
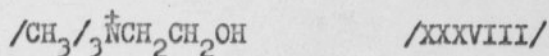
2.7. Peptydy w których grupa aminowa zastąpiona jest fosfinową.

Peptydy tego typu, stanowiące swego rodzaju ciekawostkę chemiczną, otrzymali Issleib i Kümmel ¹⁴⁴. Autorzy użyli kwasu fosfinoctowego i nie blokując reszty fosfinowej zastosowali metodę mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych aby zacylować nimi ester dwuetylowy glicyny lub sól sodową l-fenylalaniny.

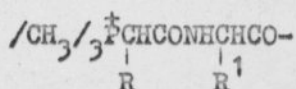


Metodami tymi otrzymywano żądane pochodne z wydajnościami 40 - 50%. Ostatnie

doniesienia literaturowe mówiące o dużym podobieństwie biologicznym między choliną /XXXVIII/ a jej fosfonowym analogiem /XXXIX/ 166,167



zdają się pozwalać na przypuszczenie, że peptydy o budowie:



mogą też posiadać ciekawe własności biologiczne.

2.8. Cele i problemy syntezy peptydów fosfonowych.

Zagadnienie syntezy peptydów w których jednym ze składników jest kwas aminofosfonowy jest interesującym nie tylko ze względu na obecność ciliatyny we frakcjach białkowych organizmów żywych.

Główne zadania i możliwości rysujące się w tej dziedzinie można podzielić ogólnie na:

opracowanie dobrych metod syntezy tych połączeń, który to problem jest niezupełnie jeszcze rozwiązany. Obecność grupy fosfonowej czy fosfinowej w cząsteczce aminokwasu zmusza do znalezienia grup chroniących te reszty, prostych metod ich wprowadzania i usuwania a także metod aktywowania grup fosfonowej i fosfinowej. Oddziaływania między grupami: fosfonową i aminową powodują pojawienie się trudności preparatywnych a co za tym idzie niemożność całkowitej adaptacji klasycznych metod syntezy peptydów. Istotne trudności sprawia też niedostępność optycznie czynnych kwasów aminofosfonowych, a także możliwość pojawienia się nowego centrum chiralnego na atomie fosforu.

otrzymywanie analogów biologicznie czynnych aligopeptydów 152,168 ,
co można uzyskać przez zastąpienie naturalnego aminokwasu jego analogiem fosfonowym lub fosfinowym w łańcuchu peptydowym. W tej dziedzinie możliwość dalszego

działania jest praktycznie nieograniczona. Wydaje się, że przy obecnym stanie wiedzy o syntezie peptydów fosfonowych można otrzymać najprostsze takie analogi przez zamienienie C-końcowego aminokwasu oligopeptydu na jego analog fosfonowy.

badanie zachowania się peptydów fosfonowych zawierających P-końcowy kwas aminofosfonowy w reakcjach enzymatycznych. Badania takie zostaną podjęte wkrótce w naszej grupie badawczej gdyż otrzymane przeze mnie peptydy zostaną zbadane jako ewentualne substraty i inhibitory peptydaz. Badania enzymatyczne mogą dać odpowiedź na nierozstrzygnięte dotychczas pytanie, czy grupa fosfonowa czy też fosfinowa jest lepszym analogiem grupy karboksylowej.

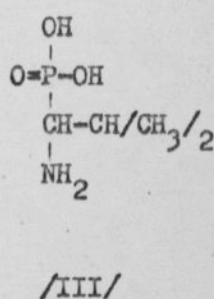
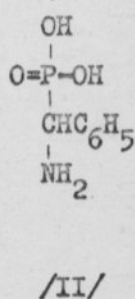
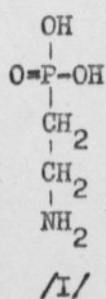
otrzymanie środków kompleksujących metale. Znane właściwości kompleksujące krótkich peptydów ¹⁶⁹ i kwasów aminofosfonowych ¹⁷⁰ pozwalają sądzić, że otrzymane peptydy fosfonowe mogą mieć takie same interesujące właściwości.

otrzymywanie optycznie czynnych kwasów aminofosfonowych, co można uzyskać przez rozdział peptydów posiadających optycznie czynny aminokwas N-końcowy i P-końcowy kwas aminofosfonowy ^{151,171}. Jest to jedna z bardzo nielicznych metod otrzymywania tych ważnych zarówno z biologicznego jak i chemicznego punktu widzenia połączeń ¹⁷²⁻¹⁷⁵. Warto nadmienić, że dotychczas opisano w literaturze tylko izomery optyczne kwasu aminobenzylfosfonowego ^{172,173}.

O wzroście zainteresowania syntezą peptydów fosfonowych może świadczyć fakt, że w momencie rozpoczynania przeze mnie badań było jedynie pięć prac poświęconych temu problemowi a obecnie ich liczba przekracza dwadzieścia i rośnie dalej.

3. BADANIA WŁASNE.

W toku badań własnych przeprowadziłem szereg prób syntezy dwupeptydów w których kwasy aminofosfonowe są kwasami P-końcowymi. Syntezy te prowadziłem używając kwasów: 2-aminoetylofosfonowego /I/, aminobenzylfosfonowego /II/ i 1-amino-2-metylopropanofosfonowego /III/ a także sporadycznie innych kwasów aminofosfonowych.



Szczególnie ważnym wydawało mi się otrzymanie peptydów ciliatyny.

Zbadałem przydatność niektórych, najczęściej stosowanych, klasycznych metod syntezy peptydów do otrzymania peptydów fosfonowych używając zarówno wolnych kwasów aminofosfonowych jak i ich estrów dwualkilowych jako substratów. Z tego powodu badanie podzieliłem na dwie grupy:

- otrzymywanie peptydów z wolnych kwasów aminofosfonowych,
- otrzymywanie peptydów z estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych.

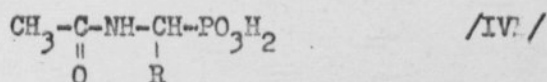
Mimo, że synteza peptydów zawierających P-końcowy kwas aminofosfonowy wydaje się być problemem stosunkowo nieskomplikowanym natrafiłem na trudności natury preparatywnej. Szereg reakcji przebiega w sposób niekorzystny, a wydzielenie czystych produktów jest niekiedy bardzo trudne.

Wydaje mi się, że udało mi się wybrać dobrą metodę syntezy tych połączeń a przy okazji rozstrzygnąć szereg kontrowersji i wyjaśnić większość niejasności zawartych w literaturze dotyczącej syntezy P-końcowych peptydów fosfonowych.

Omówiłem też dość szczegółowo widma w podczerwieni i protonowego rezonansu magnetycznego otrzymanych połączeń oraz widma węglowego rezonansu magnetycznego peptydów ciliatyny. Ten ostatni traktowałem jako potencjalny środek wyjaśnienia sposobu w jaki związany jest ten kwas a białkach.

Prócz tego przeprowadziłem szereg prób otrzymania trudnodostępnych estrów wybranych przez mnie trzech kwasów aminofosfonowych, a szczególnie estrów ciliatyny. Stosowałem różne reakcje prowadzące do syntezy tych połączeń zarówno z kwasów aminofosfonowych jak i innych substratów. Opracowałem stosunkowo prostą metodę otrzymywania estrów dwuizopropylowych kwasów α -aminofosfonowych, z łatwo dostępnych substratów wykorzystując metodę otrzymywania tych kwasów opisaną przez Tykę 176 .

Przeprowadziłem też próbę rozerwania wiązania amidowego w kwasach N-acetyloaminoalkilofosfonowych /IV/ działając na nie acylazą nerkową.



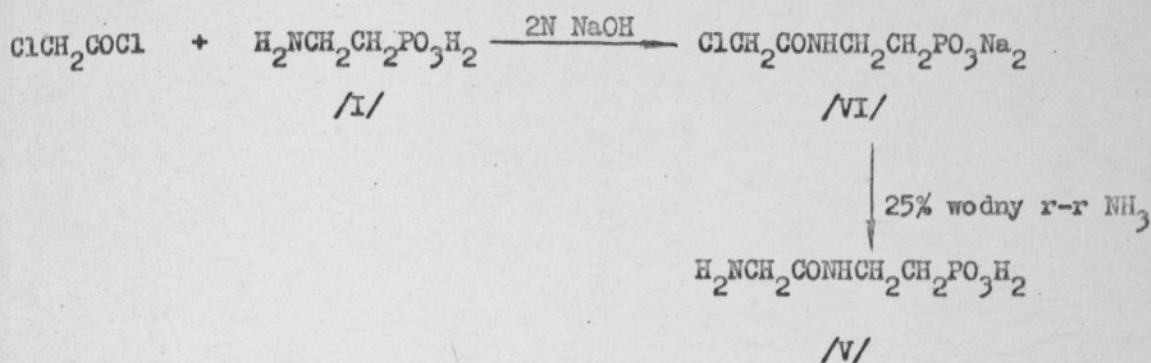
Próbie tą traktowałem jako modelową reakcję enzymatycznego rozpadu wiązania peptydowego w P-terminalnych peptydach fosfonowych. Użyłem tu pochodnych kwasów: aminometylofosfonowego /IV, R=H/, 1-aminoetylofosfonowego /IV, R=CH₃/ i aminobenzylfosfonowego /IV, R=C₆H₅/.

3.1. Synteza P-terminalnych peptydów fosfonowych z wolnych kwasów aminofosfonowych.

3.1.1. Otrzymywanie glicylociliatyny metodą Fischera.

Glicylociliatynę /V/ otrzymali z wydajnością 20% Neuzil i wsp. 146, 147 przez acylowanie wolnego kwasu 2-aminoetylofosfonowego /I/ rozpuszczonego w 2N NaOH chlorkiem kwasu chlorooctowego i następnie amonolizę otrzymanego

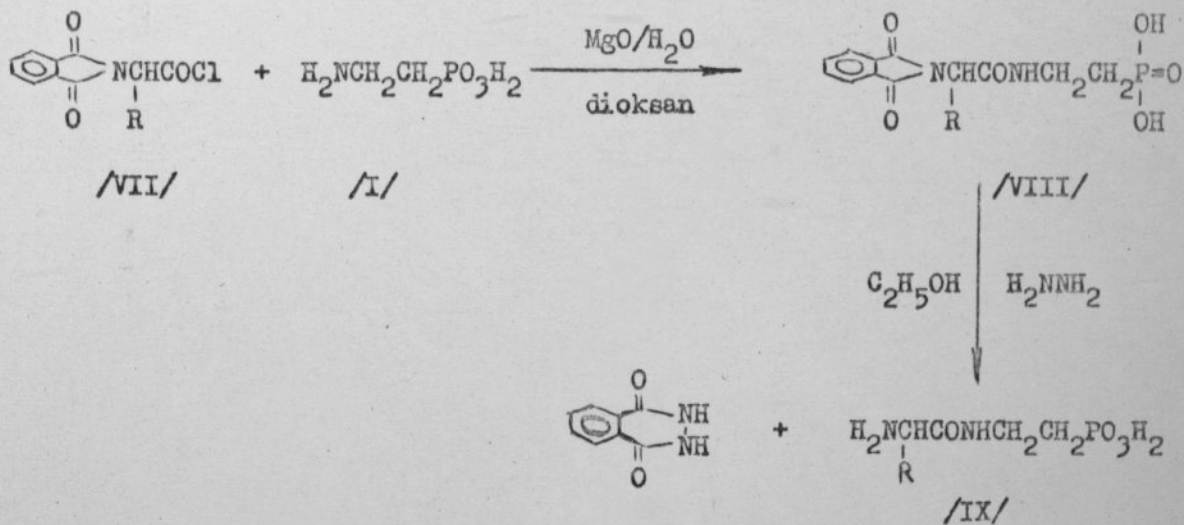
produktu /VI/.



Metodę tą zmodyfikowałem stosując w miejsce wodorotlenku sodowego nadmiar tlenu magnezowego co podniosło wydajność produktu aż do 54%. Także w przypadku acylowania ciliatyny bezwodnikiem kwasu chlorooctowego a następnie amonolizy otrzymanego produktu /VI/, w identyczny sposób, otrzymywałem glicylociliatynę /V/ z wydajnością 40%.

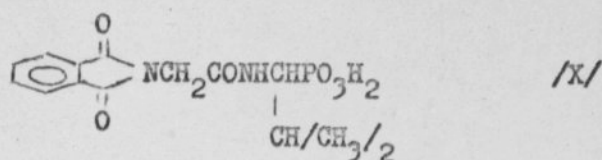
3.1.2. Acylowanie kwasów aminofosfonowych chlorkami ftaliloaminokwasów.

Metodę otrzymywania peptydów fosfonowych w reakcji acylowania wolnego kwasu aminofosfonowego chlorkiem ftaliloaminokwasu /VII/ a następnie usunięcie grupy blokującej w reakcji hydrazynolizy opracowałem równoległe z Hariharanem i wsp. 143, 148. Metodą tą usiłowałem otrzymać różne peptydy ciliatyny:



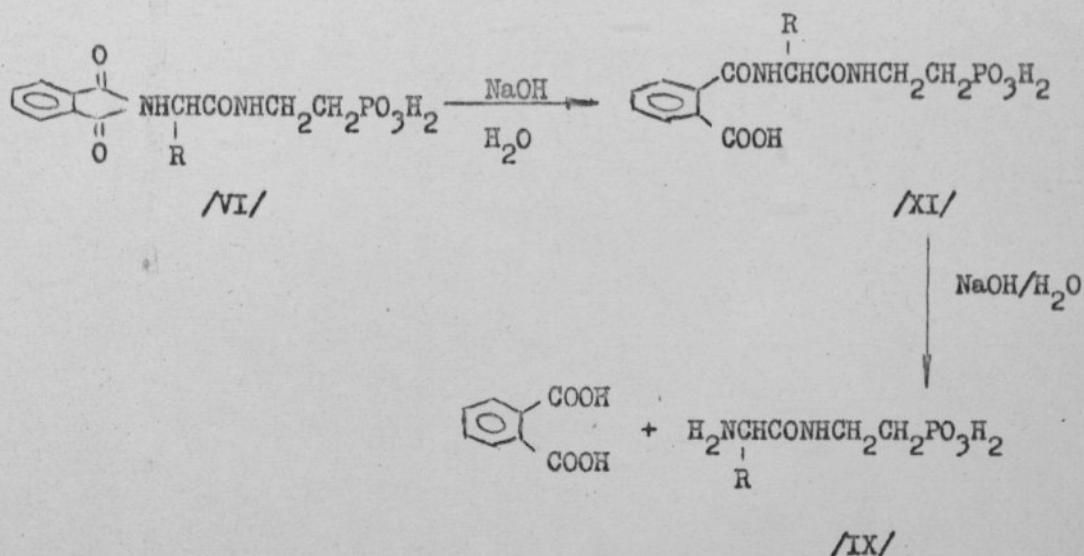
W identyczny sposób otrzymywałem kwas N-ftaliloglicylo-1-amino-2-metylopropa-

nofosfonowy /X/:



Metoda ta daje z dobrymi wydajnościami jedynie peptydy glicyny /VIII, R=H, X/ i alaniny /VIII, R=CH₃/. Udało mi się też otrzymać w ten sposób l-fenylalaninociliatynę /IX, R=CH₂C₆H₅/ nie wydzielając i charakteryzując jej N-ftalilowej pochodnej /VIII, R=CH₂C₆H₅/. Próby otrzymania ftalilo-l-leucylociliatyny /VIII, R=CH₂CH/CH₃/2/, ftalilo-d, l-walilociliatyny /VIII, R=CH/CH₃/2/ oraz kwasu N-ftalilo-l-leucylo-1-amino-2-metylopropanofosfonowego zakończyły się jednak niepowodzeniem.

Gilmore i McBride ¹⁴⁹ opisują otrzymanie w ten sam sposób kwasu N-ftaliloglicyloaminobenzylfosfonowego. Używali oni zamiast tlenku magnezu wodorotlenku sodowego jako czynnika utrzymującego żądane pH otrzymując produkt z bardzo wysoką wydajnością /86%/. Wynik ten jest zaskakujący albowiem zarówno dane literaturowe dotyczące syntezy peptydów kwasów aminokarboksylowych ¹⁷⁷ jak i moje doświadczenia prowadzone w takich samych warunkach z ciliatyną wskazują, że w takim przypadku pęka wiązanie imidowe grupy ftalilowej w otrzymanym peptydzie /VIII/ i powstaje odpowiedni imid kwasu ftalowego /XI/:



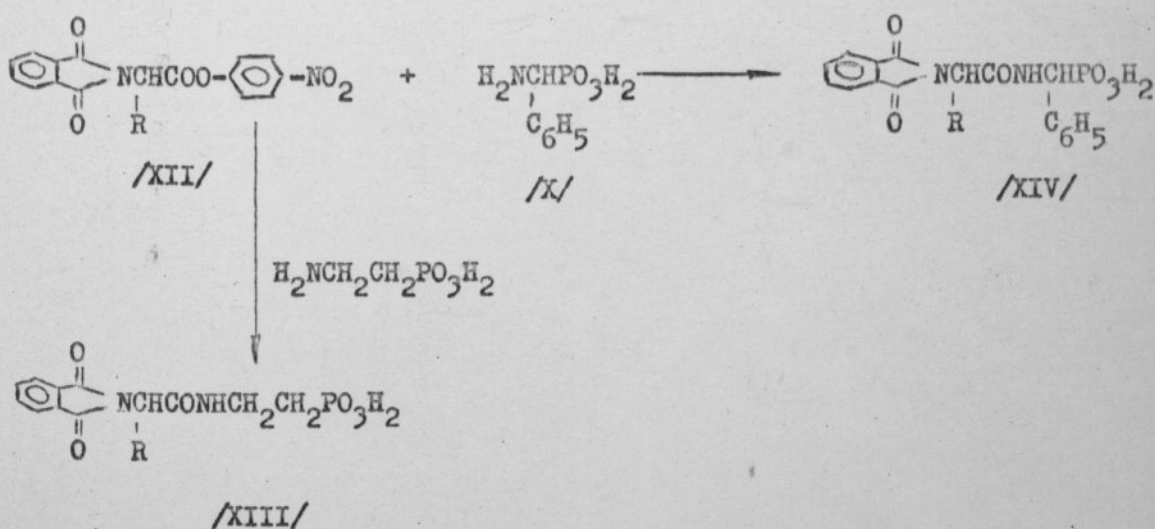
W ten sposób otrzymywałem mieszaninę produktów /IX/ i /XI/ co zmniejszało wyraźnie wydajność wolnych peptydów gdyż nie można usunąć reszty blokującej azot w pochodnej /IX/ w reakcji hydrazynolizy.

Jeśli taką mieszaninę produktów zostawiałem w alkalicznym roztworze przez dwa tygodnie otrzymywałem, z niewielką wydajnością, glicylo-/IX, R=H/ lub alanylo-ciliatynę /IX, R=CH₃/. Następuje więc hydroliza wiązania amidowego i uwolnienie peptydu. Reakcji tej towarzyszy również rozpad wiązania peptydowego co stwierdzałem używając chromatografii cienkowarstwowej.

3.1.3. Acylowanie kwasów aminofosfonowych estrami para- i orto-nitrofenylowymi N-zablokowanymi aminokwasów.

Zastosowanie aktywnych estrów / w tym wypadku pochodnych N-hydroksymidu kwasu bursztynowego / w syntezie P-terminalnych peptydów fosfonowych opisano ostatnio w niemieckim doniesieniu patentowym ¹⁵¹. Ponieważ autorzy patentu otrzymali w ten sposób kilka peptydów fosfonowych z dobrymi wydajnościami postanowiłem sprawdzić czy inne estry / to jest para- i orto-nitrofenylowe / są też dobrymi substratami.

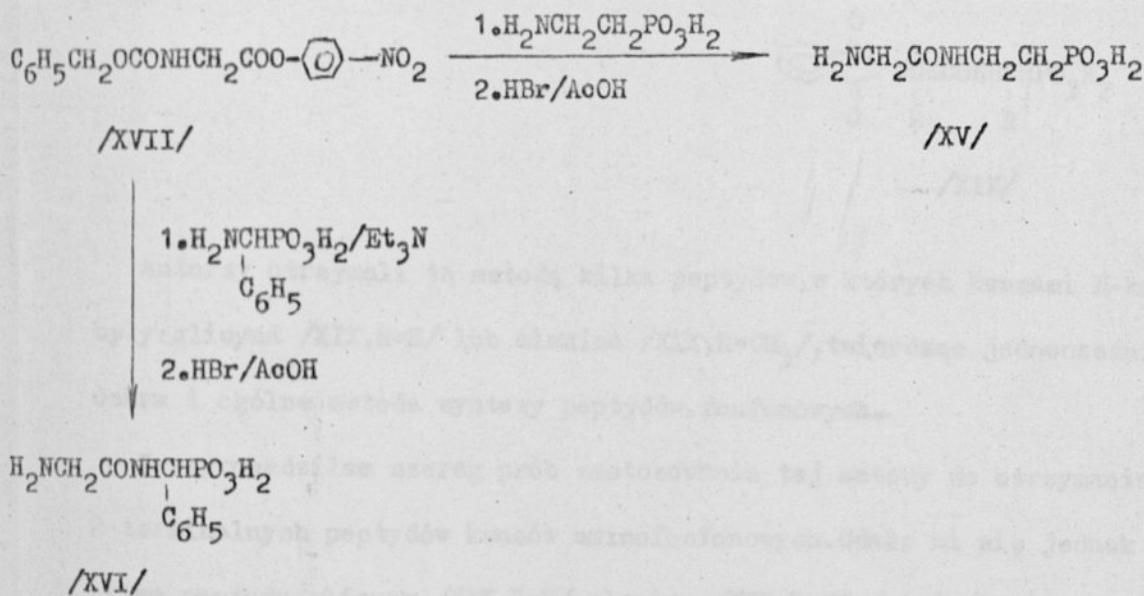
Stosując takie estry ftaliloaminokwasów /XII/ otrzymałem kilka peptydów ciliatyny /XIII/ i kwasu aminobenzylfosfonowego /XIV/:



Mimo, że reakcje te dają produkty z dobrymi wydajnościami to ich wydzielenie z mieszaniny poreakcyjnej nastręcza wiele trudności ze względu na bardzo podobne właściwości fizyczne estrów nitrofenylowych ftaliloaminokwasów /XII/ oraz powstających w tej reakcji produktów /XIII, XIV/. Reakcja prowadzona jest w środowisku zasadowym co powoduje niekiedy pęknięcie wiązania imidowego grupy ftalilowej i utworzenie odpowiedniego amidu kwasu ftalowego.

Nie udało mi się również otrzymać w ten sposób pożądaných produktów z estrów para-nitrofenylowych ftalilo-l-leucyny.

Glicylociliatynę /XV/ i kwas N-glicyloaminobenzylfosfonowy /XVI/ otrzymałem z estru para-nitrofenylowego karbobenzoksyglicyny /XVII/. W reakcji tej nie wydzielałem kwasów karbobenzoksyglicyloaminoalkilofosfonowych lecz od razu usuwałem grupę blokującą azot w reakcji bromowodorolizy. Wydajności produktów tej reakcji są jednak niewielkie.

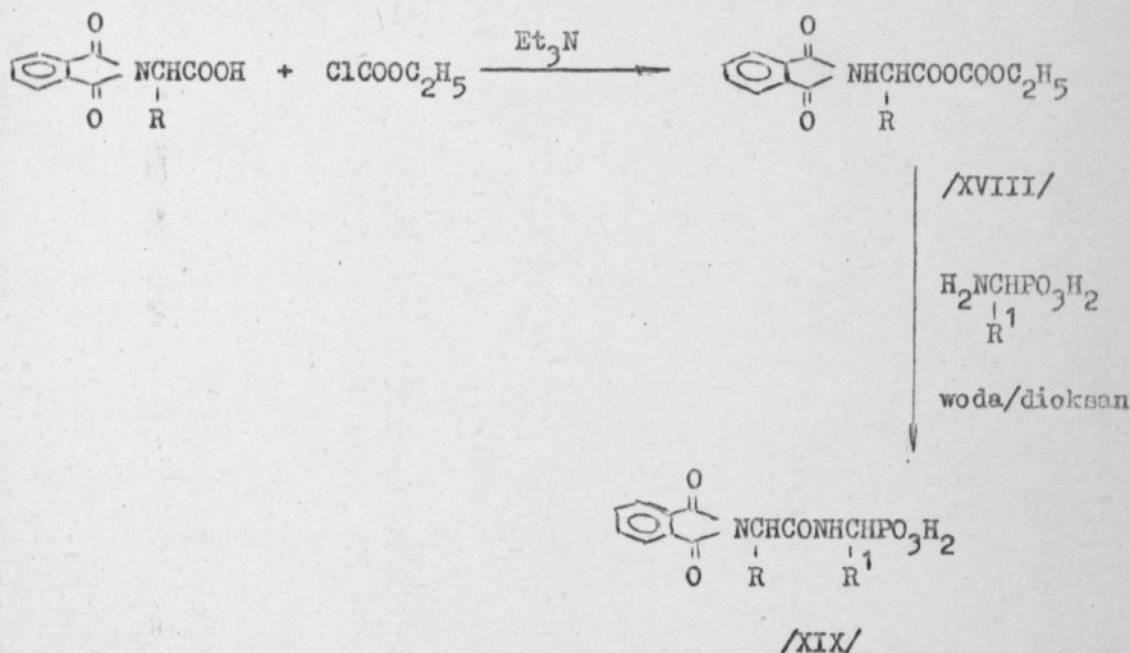


Wydaje się, że metoda aktywnych estrów może być dobrym sposobem syntezy P-końcowych peptydów fosfonowych, jednakże należy znaleźć bardziej odpowiednie grupy blokujące azot i zastosować odpowiednie aktywne estry. Poszukiwania odpowiednich warunków tej reakcji zostały podjęte w naszej grupie badawczej.

Tą część pracy zrealizowałem wspólnie ze studentką IV roku Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, koleżanką Lidią Kupczyk.

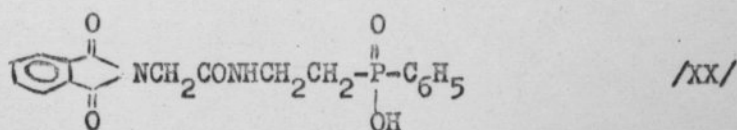
3.1.4. Synteza peptydów fosfonowych z wolnych aminokwasów metodą mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych.

Metodę tą polegającą na acylowaniu wolnych kwasów aminofosfonowych przy pomocy bezwodników /XVIII/ otrzymanych z ftaliloaminokwasów i chloromrówczanu etylu zaproponowali Hariharan i wsp. ¹⁴³.



Autorzy otrzymali tą metodą kilka peptydów, w których kwasami N-końcowymi były: glicyna /XIX, R=H/ lub alanina /XIX, R=CH₃/, twierdząc jednocześnie, że jest to dobra i ogólna metoda syntezy peptydów fosfonowych.

Przeprowadziłem szereg prób zastosowania tej metody do otrzymania różnych P-terminalnych peptydów kwasów aminofosfonowych. Udało mi się jednak otrzymać tylko peptydy glicyny /XIX, R=H/, alaniny /XIX, R=CH₃/ i β-alaniny, w tym peptyd kwasu /2-aminoetylo/fenylfosfinowego /XX/:



Nie otrzymałem natomiast peptydów fosfonowych ftalilo-l-leucyny i ftalilo-d,l-waliny w tej reakcji. Otrzymywałem tu substraty czyli produkty hydrolizy bezwodnika.

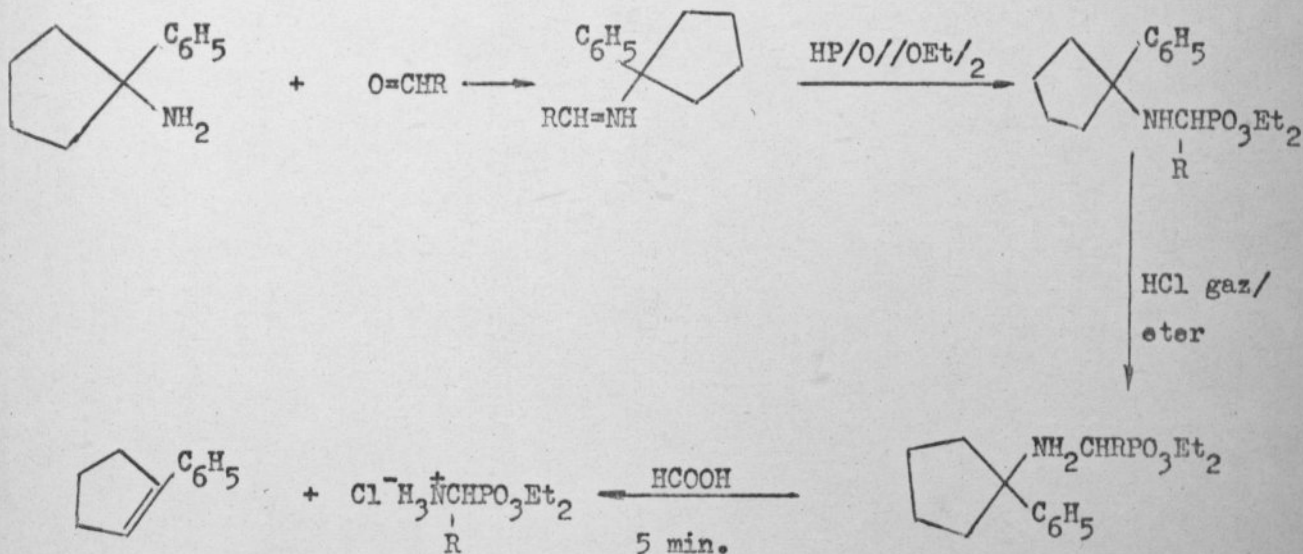
Podobnie zastosowanie karbobenzoksyglicyny i karbobenzoksy-d,l-alaniny nie doprowadziło do uzyskania żądanych produktów.

3.2. Synteza P-końcowych peptydów fosfonowych z estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych.

3.2.1. Próby syntezy estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych.

Otrzymywanie P-końcowych peptydów fosfonowych z estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych jest poważnie ograniczone przez trudną dostępność tych estrów. Dotychczas opracowano niewiele metod syntezy tych połączeń^{173,178-190} uzyskiwanych zwykle z niewielkimi wydajnościami i trudnych do wydzielenia z mieszaniny poreakcyjnej w stanie czystym. Jedynym łatwodostępnym jest ester dwuetylowy kwasu aminobenzylfosfonowego^{173,178-180}.

Dobrą wydaje się być metoda opracowana ostatnio przez Tykę i Łukszo¹⁸¹, którą przedstawia schemat:

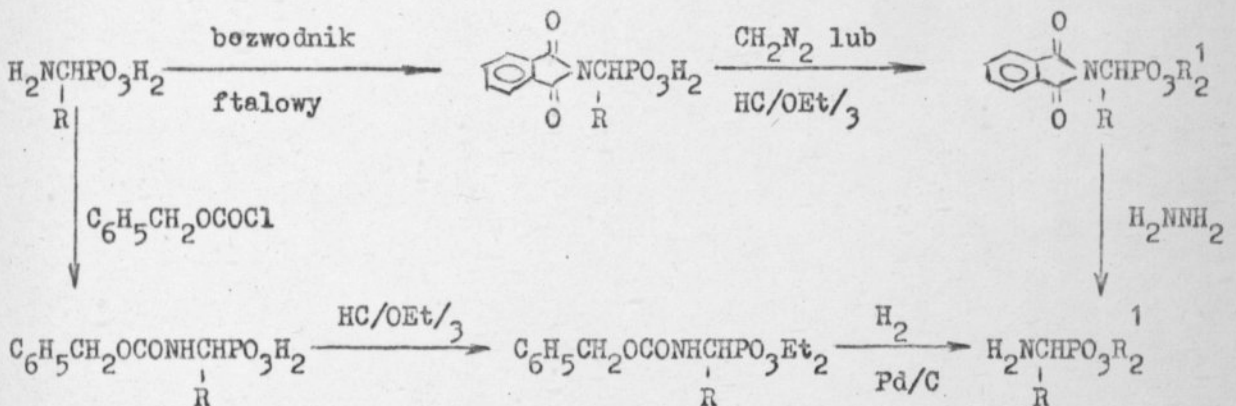


Poważną niedogodnością tej metody jest jednak trudna dostępność cyklohexylofenyloaminy.

Potrzebując estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych jako substratów do syntezy peptydów przeprowadziłem szereg prób otrzymywania tych połączeń.

Próby te opisuje poniżej:

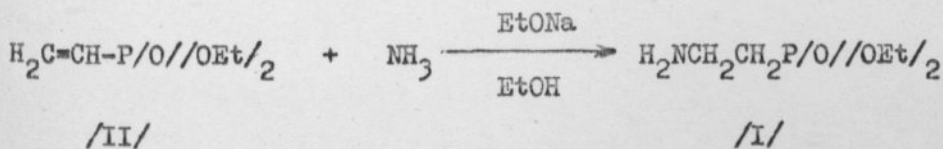
Osobnym i jednym z najważniejszych zagadnień w chemii kwasów aminofosfonowych jest otrzymanie ich estrów z wolnych kwasów w sposób możliwie jak najprostszy. Opracowana dotychczas metoda^{149,188} polegająca na blokowaniu grupy aminowej kwasu aminofosfonowego, estryfikacji otrzymanej pochodnej dwuazometanem lub orto-mrówczanem etylu a następnie usuwaniu grupy chroniącej resztę aminową jest zbyt skomplikowana i daje estry z niewielkimi wydajnościami oraz trudne do oczyszczenia. Metodę tę obrazuje schemat:



Omówieniu moich prób otrzymania estru dwuetylowego ciliatyny z wolnego kwasu 2-aminoetylofosfonowego poświęciłem więc osobny rozdział.

3.2.1.1. P r ó b y syntezy estru dwuetylowego ciliatyny.

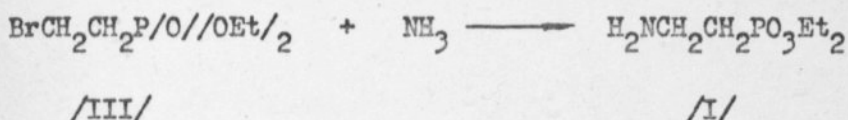
Ester dwuetylowy ciliatyny /I/ został po raz pierwszy opisany przez Pudowika i Denisową^{189,190}, którzy otrzymali go w reakcji przyłączenia amoniaku do winylofosfonianu dwuetylowego /II/ wobec katalitycznych ilości etylanu sodu:



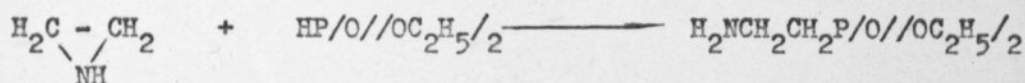
Przeprowadziłem kilkanaście prób otrzymania 2-aminoetylofosfonianu dwuetylowego /I/ tą metodą, różnie modyfikując warunki tej reakcji. Nie otrzymałem jednak nigdy żądanego produktu. Niemożliwość otrzymania tego estru w reakcji opisanej przez Pudowika i Denisową została potwierdzona w niezależnych eksperymentach

przeprowadzonych w Zakładzie Związków Fosforoorganicznych Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej.

Także próby wymiany bromu w 2-bromoetylofosfonianie dwuetylowym /III/ na grupę aminową prowadzone w różnych warunkach nie przyniosły spodziewanych efektów. Zamiast estru dwuetylowego ciliatyny otrzymywałem winylofosfonian dwuetylowy /II/ lub rozpuszczalny jedynie w stężonym kwasie azotowym polimer.

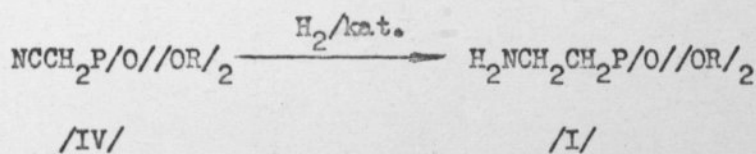


Inną metodę otrzymywania tego estru opatentowali Kinoshi i wsp. ¹⁸⁶. Traktowali oni roztwór etylenoiminy w etanolu fosforynem dwuetylowym utrzymując temperaturę poniżej 0°C:



Niestety także i tą metodą nie udało mi się otrzymać żądanego produktu. Otrzymywałem produkt polimeryzacji etylenoiminy.

Zwróciłem zatem uwagę na metody otrzymywania 2-aminoetylofosfonianu dwuetylowego przez redukcję cyjanometylofosfonianu dwuetylowego /IV/:



Reakcja ta została opisana przez Isbella i wsp. ¹⁸⁴ /którzy prowadzili uwodornienie w roztworze metanol-rozcieńczony kwas solny, w temperaturze pokojowej i pod normalnym ciśnieniem używając 30% palladu na węglu aktywnym jako katalizatora/ oraz w patencie niemieckim ¹⁸⁵ /autorzy prowadzili ten proces w obecności amoniaku, pod ciśnieniem 100 atm, w temperaturze pokojowej używając niklu Raneya jako katalizatora/.

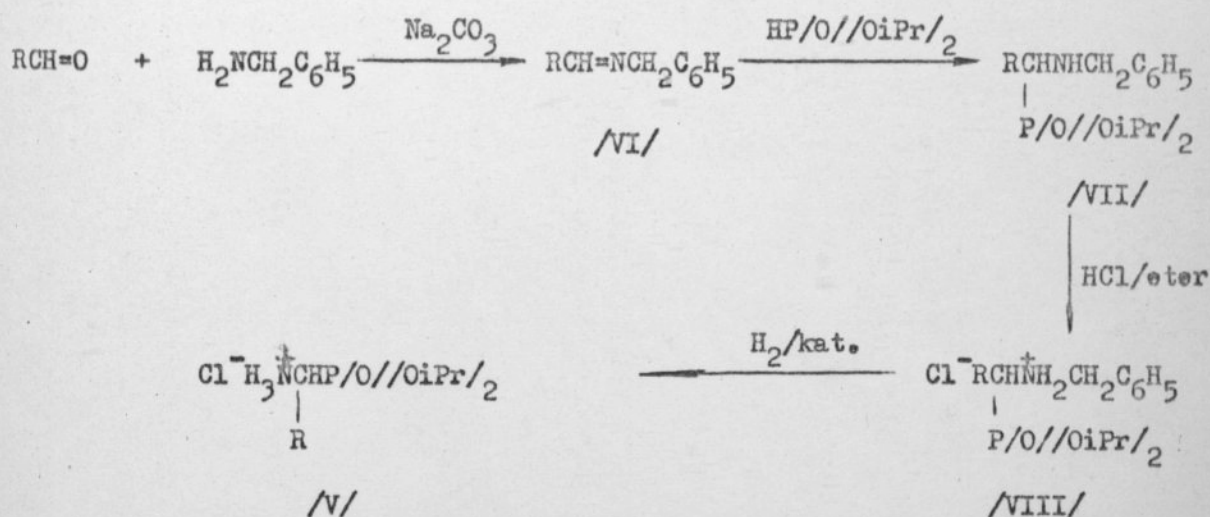
Obiema tymi metodami otrzymywałem 2-aminoetylofosfoniany: dwuetylowy /I, R=Et/ i dwuizopropylowy /I, R=CH/CH₃/₂/.

Reakcja opisana przez Isbella i wsp. ¹⁸⁴ jest bardziej kłopotliwa gdyż jej przebieg silnie zależy od obecności, bardzo niewielkich nawet ilości, zanieczyszczeń w cyjanometylofosfonianie dwuetylowym /IV/ lub wodorze użytym do redukcji.

3.2.1.2. Synteza chlorowodorków estrów dwuizopropylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych.

Opracowałem wygodną, stosunkowo prostą metodę otrzymywania chlorowodorków aminobenzylfosfonianu dwuizopropylowego /V, R=C₆H₅/ i 1-amino-2-metylopropano-fosfonianu dwuizopropylowego /V, R=CH/CH₃/₂/ modyfikując opisaną przez Tykę ¹⁸⁶ metodę syntezy kwasów aminofosfonowych.

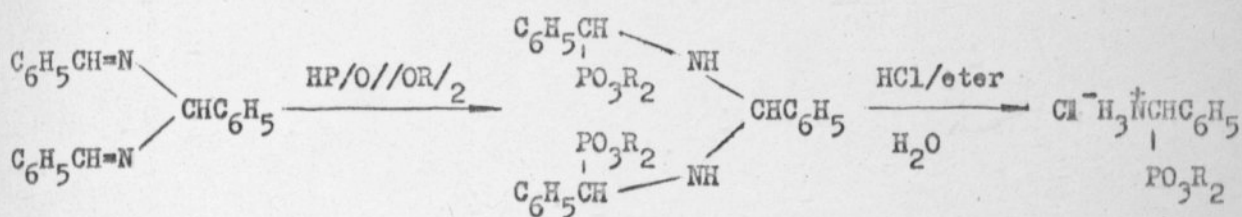
Do otrzymanej z odpowiedniego aldehydu i benzyloaminy zasady Schiffa /VI/ przyłączałem fosforyn dwuizopropylowy otrzymując N-benzyl-1-aminoalkilofosfoniany dwuizopropylowe /VII/, które wydzielałem w postaci chlorowodorków /VIII/ przepuszczając gazowy, suchy chlorowódor przez eterowy roztwór fosfonianu. Redukcja otrzymanych chlorowodorków /VIII/ prowadziła do uzyskania żądanych produktów /V/.



Wydaje się, że tą metodą można też otrzymywać chlorowodorki innych 1-aminoalkilofosfonianów dwaalkilowych.

Metoda ta odznacza się stosowaniem prostych, łatwo dostępnych substratów oraz stosunkowo wysokimi wydajnościami.

Chlorowodorki aminobenzylfosfonianów dwualkilowych otrzymywałem też metodą opisaną przez Rogożina i wsp. ¹⁷³, którą przedstawiłem na schemacie poniżej:

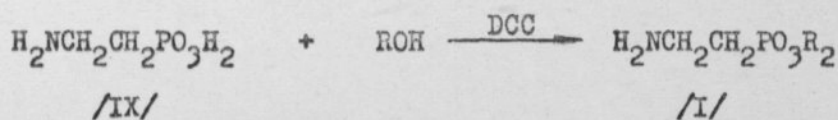


3.2.1.3. P r ó b y syntezy estrów dwualkilowych ciliatyny z wolnego aminokwasu.

Synteza estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych z wolnych kwasów jako substratów /niektóre z nich produkowane są przez firmę "Calbiochem" i można je kupić/ wydaje się być jednym z najpilniejszych zadań chemii peptydów fosfonowych.

Z tego też powodu wydało mi się ważnym przeprowadzenie prób syntezy estrów ciliatyny z wolnego kwasu 2-aminoetylofosfonowego.

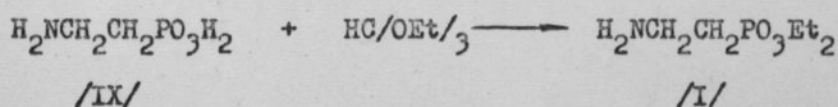
W pierwszych próbach usiłowałem uzyskać te połączenia estryfikując ciliatynę /IX/ alkoholem etylowym lub benzylovym wobec DCC:



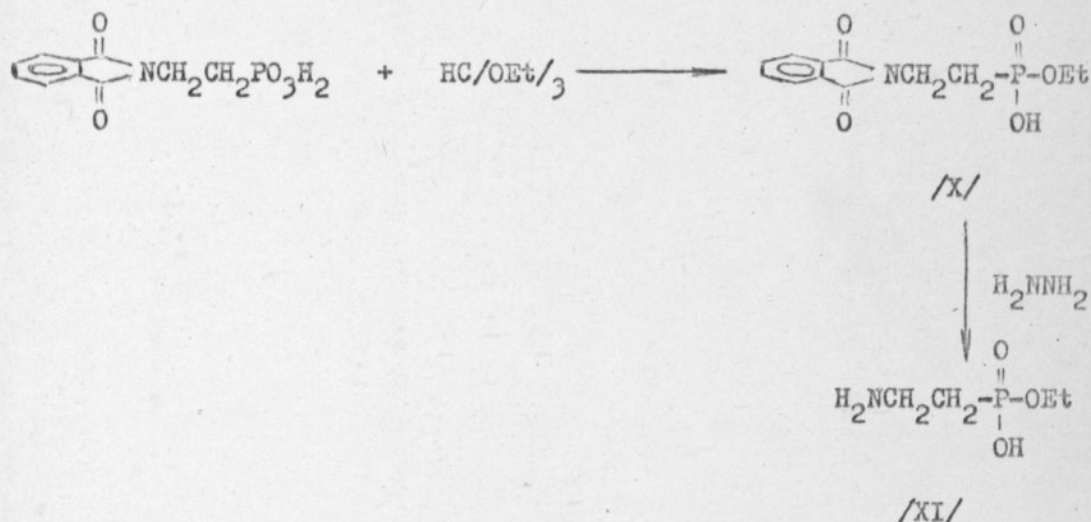
Jednak pomimo ponad trzydziestogodzinnego ogrzewania mieszaniny substratów nie zaobserwowałem przebiegu jakiegokolwiek reakcji.

Długotrwałe ogrzewanie kwasu 2-aminoetylofosfonowego, jego chlorowodorku czy tozylanu w ortomrówce etylu nieprowadziło do otrzymaniażądanego produktu.

Otrzymywałem spowrotem nieprzereagowane substraty.



Zwróciłem zatem uwagę na użycie ftalilocyliatyny w tej ostatniej reakcji. Jednakże ogrzewanie ftalilocyliatyny z nadmiarem ortomrówczanu etylu dało w efekcie ester monoetylowy tego połączenia /X/, który w reakcji hydrazynolizy dawał nieco zanieczyszczony 2-aminoetylofosfonian monoetylowy /XI/.



Później Gilmore i Mc Bride ¹⁴⁹ opisali otrzymywanie estru dwuetylowego kwasu aminobenzylfosfonowego w tej reakcji. Osiągnęli oni to usuwając ze środowiska reakcji powstający w niej etanol.

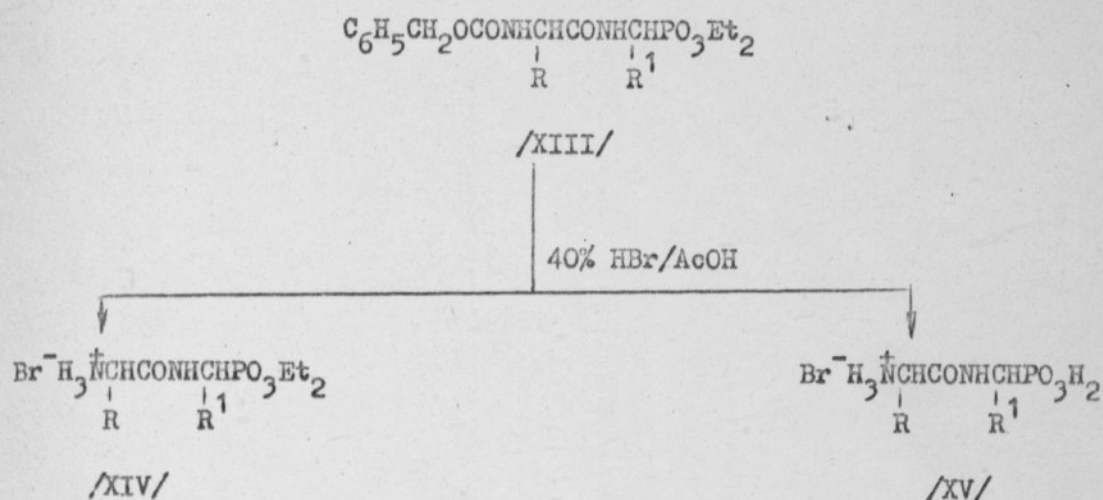
3.2.2. Próby syntezy peptydów fosfonowych metodą DCC.

Zarówno Gilmore i McBride ^{149,155,156} jak i Yamauchi i wsp. ^{157,163,164} stwierdzili, że zastosowanie dwucykloheksylokarbodiimidu /DCC/ jako czynnika sprzęgającego w syntezie peptydów fosfonowych daje dobre rezultaty i metoda ta wydaje się być ogólną.

Spróbowałem ją zatem zastosować do otrzymania P-terminalnych peptydów wybranych przez mnie kwasów aminofosfonowych.

W syntezach tych używałem aminokwasów, w których grupę aminową blokowałem resztą benzyloksykarbonylową /C₆H₅CH₂OCO-/ gdyż pozwala to na usunięcie grup chroniących fosfor i azot otrzymanego peptydu /XIII/ w jednej reakcji /działa-

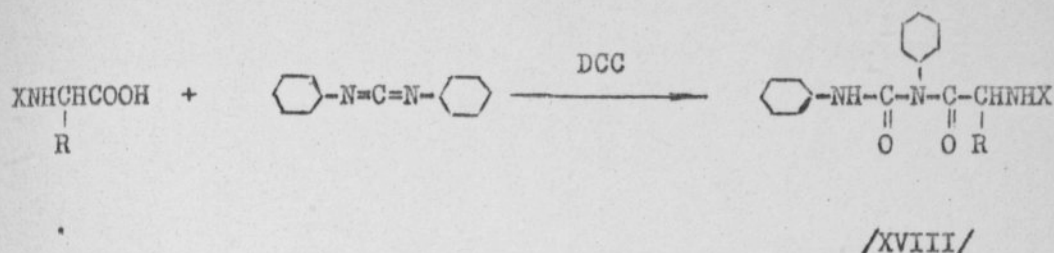
niem 40% roztworu bromowodoru w lodowatym kwasie octowym/:

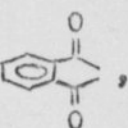


W literaturze istnieją dwie, skrajnie różne, informacje dotyczące odblokowania takich fosfonopeptydów /XIII/. Buriczenko i Poroszin¹⁵²⁻¹⁵⁴ twierdzą, że utrzymywanie tych połączeń w 40% HBr w lodowatym kwasie octowym w temperaturze pokojowej przez kilka godzin daje produkty odblokowania tylko N-końca peptydu /XIV/. Gilmore i MoBride^{149,155,156} zaś twierdzą, że wystarczy poprowadzić tą reakcję w takich warunkach przez dwie godziny aby otrzymać kompletnie odblokowany dwupeptyd /XV/.

Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia wskazują, że działanie 40% bromowodem w kwasie octowym na zablokowany dwupeptyd /XIII/, w temperaturze pokojowej przez dwie godziny daje usunięcie grup chroniących zarówno N- jak i P-koniec. Jednakże w tych warunkach reakcja nie przebiega do końca i otrzymuje się nieco innego produktu niż pożądaný /XV/, prawdopodobnie jego monoestru /co stwierdzam stosując chromatografię cienkowarstwową/. Utrudnia to oczyszczenie otrzymanego peptydu.

Opracowana przeze mnie metoda polega na ogrzewaniu P,N-zablokowanego peptydu z 40% Hbr w kwasie octowym w temperaturze 50-60°C przez 30 minut. W warunkach tych reakcja przebiega do końca i nie ulega rozerwaniu wiązanie peptydowe.



Gdzie: $\text{X} = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OCO-}$,  ,

$\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{CH}/\text{CH}_3/2, \text{CH}_2\text{CH}/\text{CH}_3/2, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

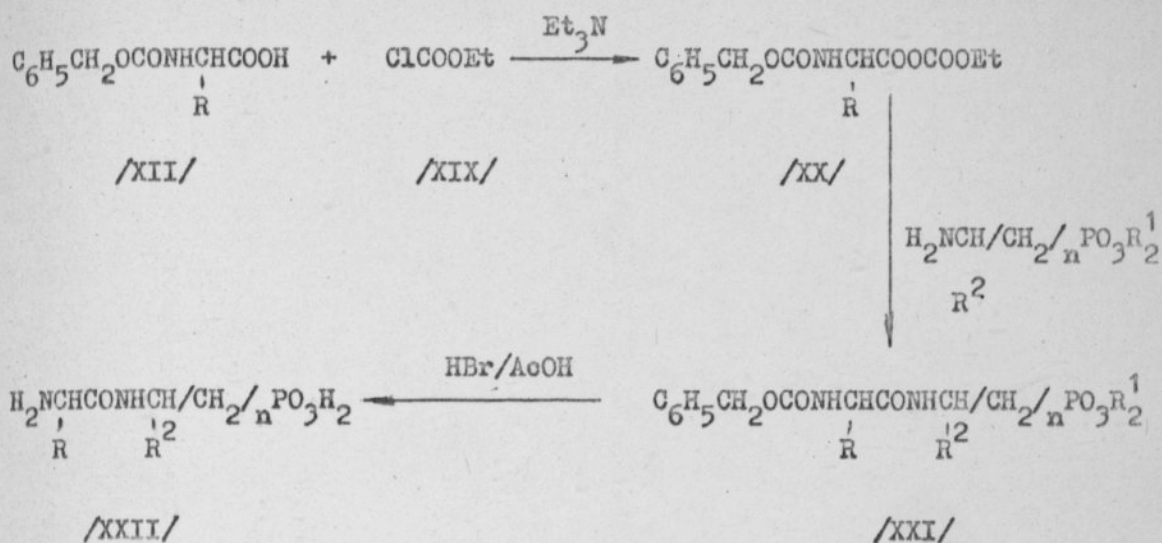
Niektóre z tych pochodnych udało mi się wydzielić w stanie czystym, pozostałe scharakteryzowałem przy pomocy widm ir i nmr /zanieczyszczone są one pożądanym peptydem, co wykazałem rozdzielając oba produkty w przypadku reakcji ftalilo- β -alaniny z estrem dwuizopropylowym kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego/.

Taki przebieg reakcji jest nieco zaskakujący dlatego, że wydajności N-acylo-dwucykloheksylomoczników są stosunkowo wysokie a żądane peptydy powstają w bardzo niewielkich ilościach. Ponadto ta sama reakcja dawała dobre rezultaty gdy używałem kwasu aminobenzylfosfonowego i karbobenzoksyaminokwasów.

3.2.3. Synteza peptydów fosfonowych metodą mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych.

Metoda ta została użyta w pierwszych pracach opisujących syntezę zablokowanych peptydów fosfonowych zawierających P-końcowy kwas aminofosfonowy przez Buriozenkę i Poroszina ¹⁵²⁻¹⁵⁴. Prace tych autorów zawierają jednak sporo niejasności i informacji błędnych.

Metodę tą zastosowałem z powodzeniem, otrzymując peptydy trzech wybranych przeze mnie kwasów aminofosfonowych z dobrymi wydajnościami.

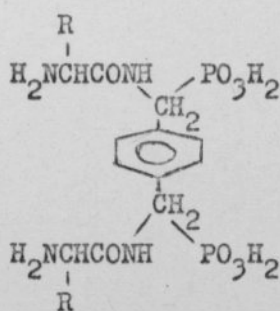


gdzie: $\text{R}^2 = \text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH/CH}_3\text{/}_2$ gdy $n = 0$

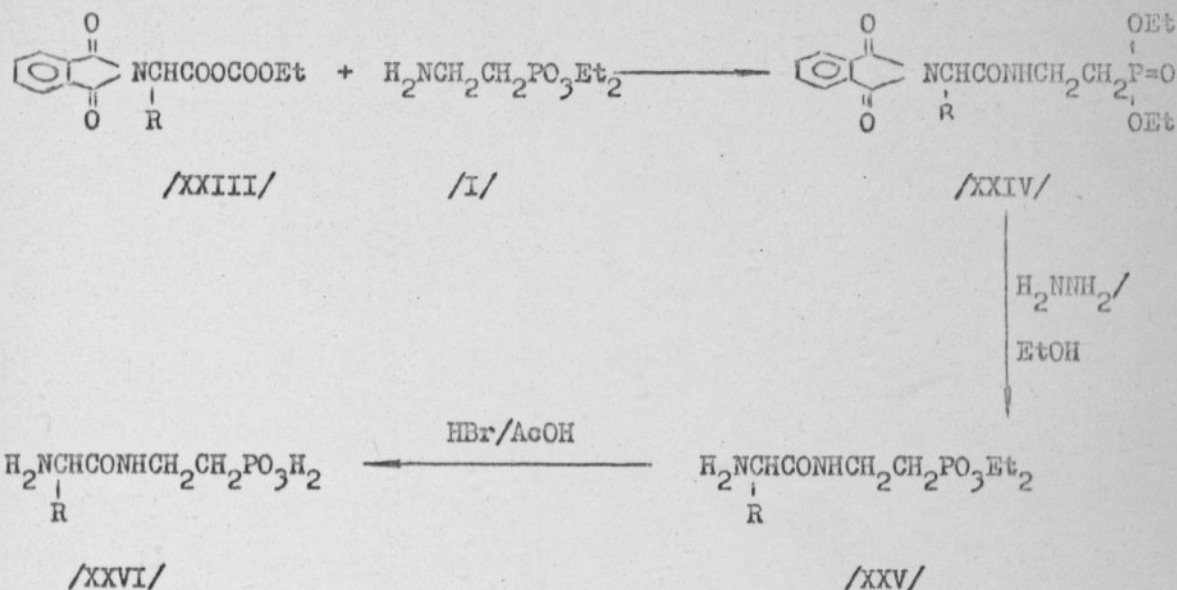
$\text{R}^2 = \text{H}$ gdy $n = 1$

Peptydy te otrzymywałem używając karbobenzoksyaminokwasów /XII/, które przeprowadzałem w mieszane bezwodniki /XX/ działaniem chloromrówezanu etylu /XIX/ wobec trójetyloaminy, a następnie acylując nimi estry dwualkilowe kwasów aminofosfonowych. Tak otrzymanych, całkowicie zablokowanych peptydów nie wydzielałem w stanie czystym ale poddawałem od razu reakcji bromowodorolizy 40% HBr w kwasie octowym otrzymując bromowodorki odblokowanych peptydów. Bromowodorki te rozpuszczałem w etanolu i wytrącałem odblokowane dwupeptydy /XXII/ przy pomocy pirydyny lub tlenku propylenu /wiążą one bromowodór/.

W ten sam sposób otrzymałem też, wychodząc z dostępnego w naszym zespole estru, peptydy o budowie:



Podobnie syntezowałem peptydy kwasu 2-aminoetylofosfonowego używając ftaliloaminokwasów jako substratów:



Stosowałem tu tylko inną, odpowiednią dla tych połączeń procedurę usuwania grup chroniących.

Wydzieliłem też w stanie chemicznie czystym jeden z produktów tej sekwencji reakcji a mianowicie ester dwuetylowy ftalilo-l-fenylalaninociliatyny /XXIV, R = -CH₂C₆H₅/. Wydzielenie tego połączenia w stanie czystym obniża jednak poważnie całkowitą wydajność reakcji.

Metoda mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych jest według mnie najlepszą z dotychczas zastosowanych metod syntezy P-końcowych peptydów fosfonowych.

3.3. Widma w podczerwieni, ¹H i ¹³C nmr otrzymanych peptydów.

3.3.1. W i d m a w podczerwieni P-terminalnych peptydów fosfonowych.

W literaturze ^{146,160} omówiono szczegółowo widma w podczerwieni czterech P-terminalnych peptydów kwasów aminofosfonowych /glicylowe i β-alanylowe pochodne kwasów: aminometylofosfonowego i 2-aminoetylofosfonowego/. Autorzy stosując analizę konformacyjną przypisują poszczególne drgania grup atomów odpowiednim pasmom absorpcji w widmach w podczerwieni i ramanowskich. Na wynikach tych prac opieram swoje przypisania pasm absorpcji w widmach ir peptydów fosfonowych.

Widma w podczerwieni są bardzo dobrym sposobem stwierdzenia utworzenia się wiązania peptydowego oraz szybkiej identyfikacji produktów reakcji sprzęgania.

Na rysunku 1. podałem wykresy widm : glicylociliatyny /I/, kwasu N- β -alanilo-1-amino-2-metylopropanofosfonowego /II/ i kwasu N-1-proliloaminobenzylfosfonowego /III/.

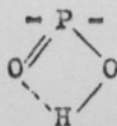
Widma te są ze sobą nieomal identyczne i wykresy widm innych peptydów są również bardzo podobne do przedstawionych na rysunku. Są one stosunkowo złożone i większość pasm absorpcji, podobnie jak w przypadku kwasów aminofosfonowych ¹⁹⁴ trudno jest przypisać w sposób jednoznaczny drganiom określonych grup.

Wszystkie widma mają charakterystyczne, silne pasma absorpcji wynikające z obecności wiązania peptydowego, a mianowicie: wywołane drganiami rozciągającymi grupy NH pasmo położone około 3300 cm^{-1} i grupy CO pasmo położone między 1650 a 1670 cm^{-1} oraz pasmo wynikające z drgań deformacyjnych amidowego NH, tak zwane I pasmo amidowe przy 1550 cm^{-1} .

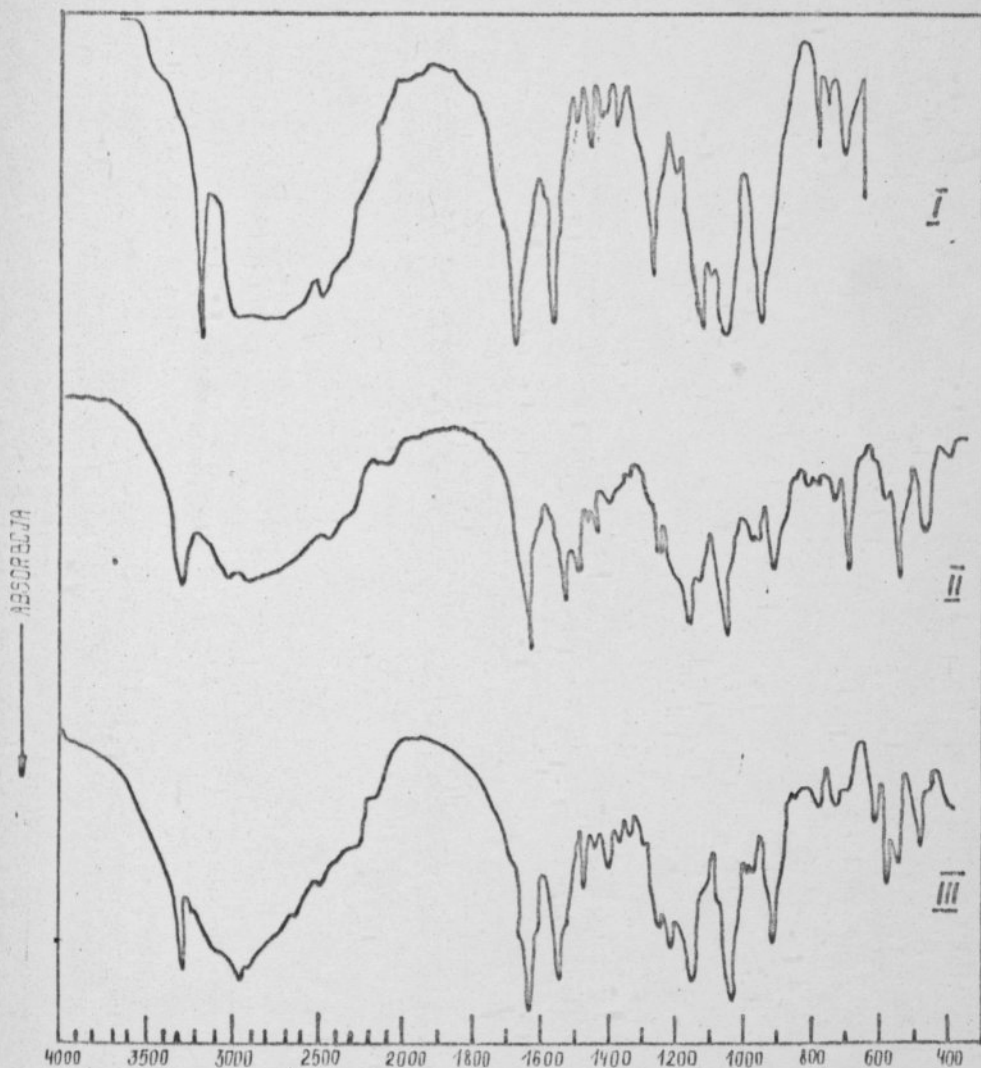
Szerokie i trudne do interpretacji pasmo w granicach $2700 - 3650\text{ cm}^{-1}$ jest charakterystyczne dla układów z silnymi wiązaniami wodorowymi, a w szczególności dla układów o charakterze jonu obojnego jak na przykład kwasy aminofosfonowe ¹⁹⁴. Tak więc peptydom też należy przypisać strukturę $\text{H}_3\overset{+}{\text{N}}\dots\text{PO}^-$.

Dwa silne pasma przy $1160 - 1190\text{ cm}^{-1}$ i około 1040 cm^{-1} przypuszczalnie wywołane są symetrycznymi i antysymetrycznymi drganiami rozciągającymi grupy $\text{O}=\text{P}-\text{O}^-$.

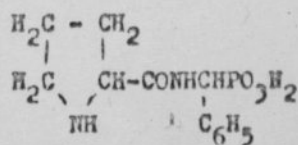
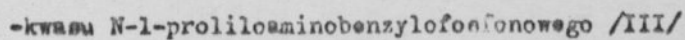
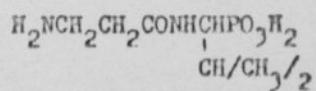
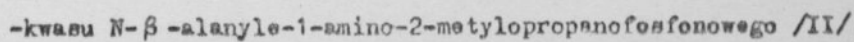
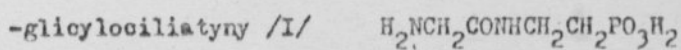
Brak jest natomiast lub jest stosunkowo słabe pasmo absorpcji przy około 1200 cm^{-1} /powinno tu być bardzo silne pasmo charakterystyczne dla drgań rozciągających grupy fosforylowej $\text{P}=\text{O}$ /. Spowodowane jest to przypuszczalnie przez oddziaływanie tej grupy z grupą OH przez wiązanie wodorowe ¹⁹⁴ :



Na rysunku 2. przedstawiłem widma ftaliloglicyny i kwasu N-ftalilo- β -alaniloaminobenzylfosfonowego /odpowiednio IV i V/. Widma pozostałych N-ftalilopeptydów



Rysunek 1. Widma w podczerwieni P-terminalnych peptydów fosfonowych:



są bardzo podobne i podobnie jak widma odblokowanych peptydów stosunkowo złożone i trudne do interpretacji.

Wszystkie widma mają bardzo charakterystyczne, silne pasma wynikające zarówno z obecności wiązania peptydowego jak i reszty ftalilowej w cząsteczce. Drganiom rozciągającym grup NH i CO wiązania peptydowego odpowiadają wyraźne, silne pasma leżące odpowiednio około 3300 cm^{-1} i $1650\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$. Pierwsze pasmo amidowe /deformacyjne drgania grupy NH/ pojawia się w okolicach 1560 cm^{-1} .

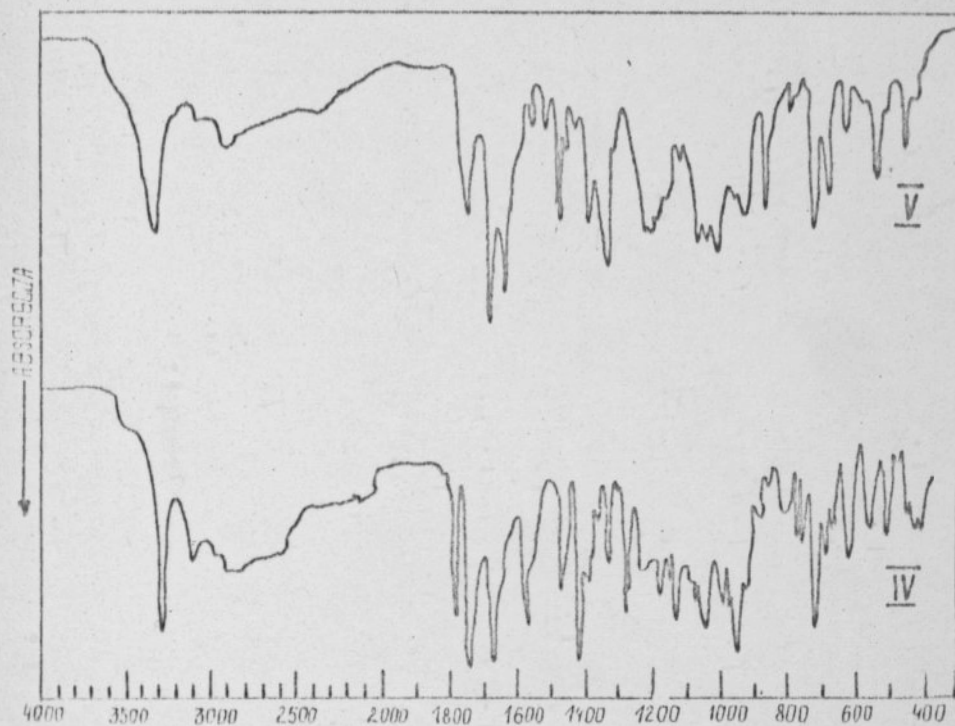
Bardzo charakterystyczny jest układ dwóch pasm wynikających z obecności grupy ftalilowej. Są to: silny i bardzo ostry pik przy 1780 cm^{-1} oraz silne pasmo odpowiadające drganiom rozciągającym imidowych grup CO przy $1720\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$.

Słabe choć wyraźne pasmo w okolicach 1200 cm^{-1} przypisakem absorpcji drgania rozciągającego grupy P=O. Niewielki udział tej absorpcji w widmie można tłumaczyć istnieniem wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych.

3.3.2. W i d m a protonowego rezonansu magnetycznego P-końcowych peptydów fosfonowych.

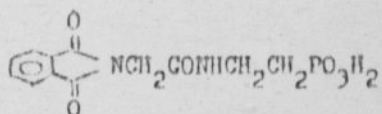
Harisharan i wsp. ¹⁴³ opisali i krótko omówili widma ^1H nmr otrzymanych przez siebie peptydów. Widma te sporządzano używając roztworu NaOD w ciężkiej wodzie. Moje doświadczenia wykazują, że lepiej jest stosować roztwór deuterowanego kwasu siarkowego gdyż otrzymane w ten sposób widma są bardziej czytelne i przesunięcie chemiczne poszczególnych sygnałów mniej jest zależne od stężenia peptydu i pH w badanej próbce.

Widma nmr dobrze potwierdzają budowę otrzymanych produktów jednakże nie są one zbyt dobrą metodą identyfikacji otrzymanych związków gdyż są bardzo podobne do widm równomolowych mieszanin aminokwasów z których zbudowana jest cząsteczka peptydu. Pokazałem to na przykładzie widm glicylociliatyny/I/ i mieszaniny glicyny i ciliatyny na rysunku 3.

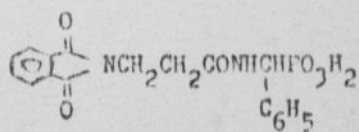


Rysunek 2. Widma w podczerwieni:

-ftaliloglicylociliaty /IV/



-kwasu N-ftalilo- -alaninobenzylfosfonowego:



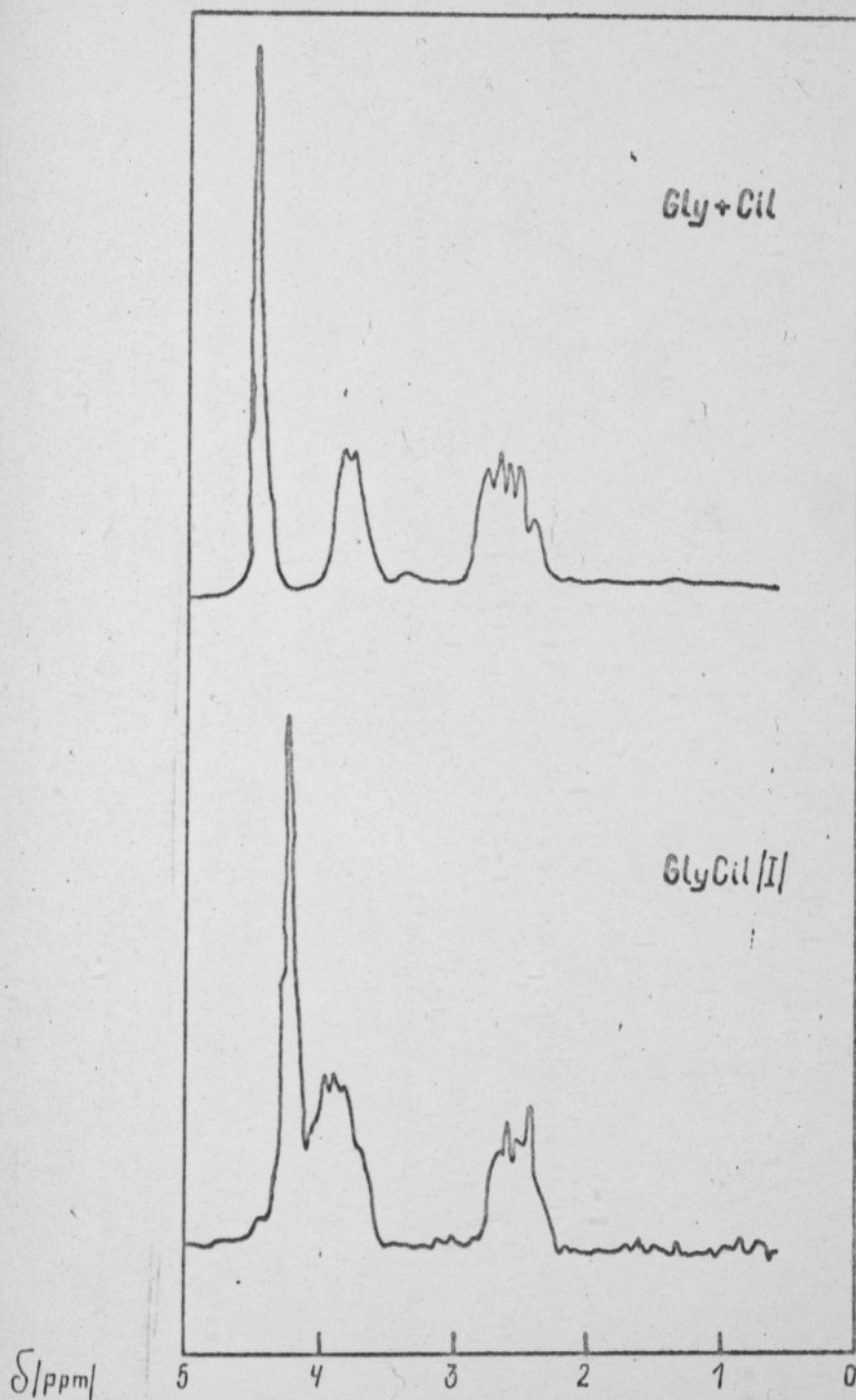
Różnica przesunięć chemicznych położenia grupy metylenowej jest stosunkowo niewielka i nie musi wynikać z różnych struktur badanych związków a, jak wykazuje doświadczenie, może zależeć od stężenia peptydu w próbce i od pH /widma nie były niestety wykonywane w identycznych warunkach/. Ponieważ widma nmr nie stanowią moim zdaniem dobrej metody identyfikacji otrzymanych produktów nie ująłem ich w tabeli 1 w części doświadczalnej, która podaje dane fizykochemiczne otrzymanych peptydów.

Natomiast w tym miejscu omawiam kilka przykładowych widm otrzymanych połączeń. Na rysunku 4. pokazałem widma d,l-alanylociliatyny /VI/ i d,l-walilociliatyny /VII/. Widma te sporządzano w roztworze D_2SO_4 w D_2O wobec HMDSz jako wzorca. Charakterystyczne są tu wspólne dla obu związków sygnały protonów metylenowych ciliatyny. Pierwszy z nich leżący około 2,60 ppm/wszystkie przesunięcia chemiczne podaję w jednostkach δ / jest sygnałem grupy CH_2 związanej z fosforem /a nie jak podaje Hariharan ¹⁴³ z azotem/. Jest to układ dwóch trypletów o stałych sprzężeń: $J_{CH-CH} = 7,0$ Hz oraz $J_{PCH} = 18,0$ Hz. W przypadku walilociliatyny sygnał ten nakłada się z sygnałem grupy CH związanej z dwoma resztami metylowymi.

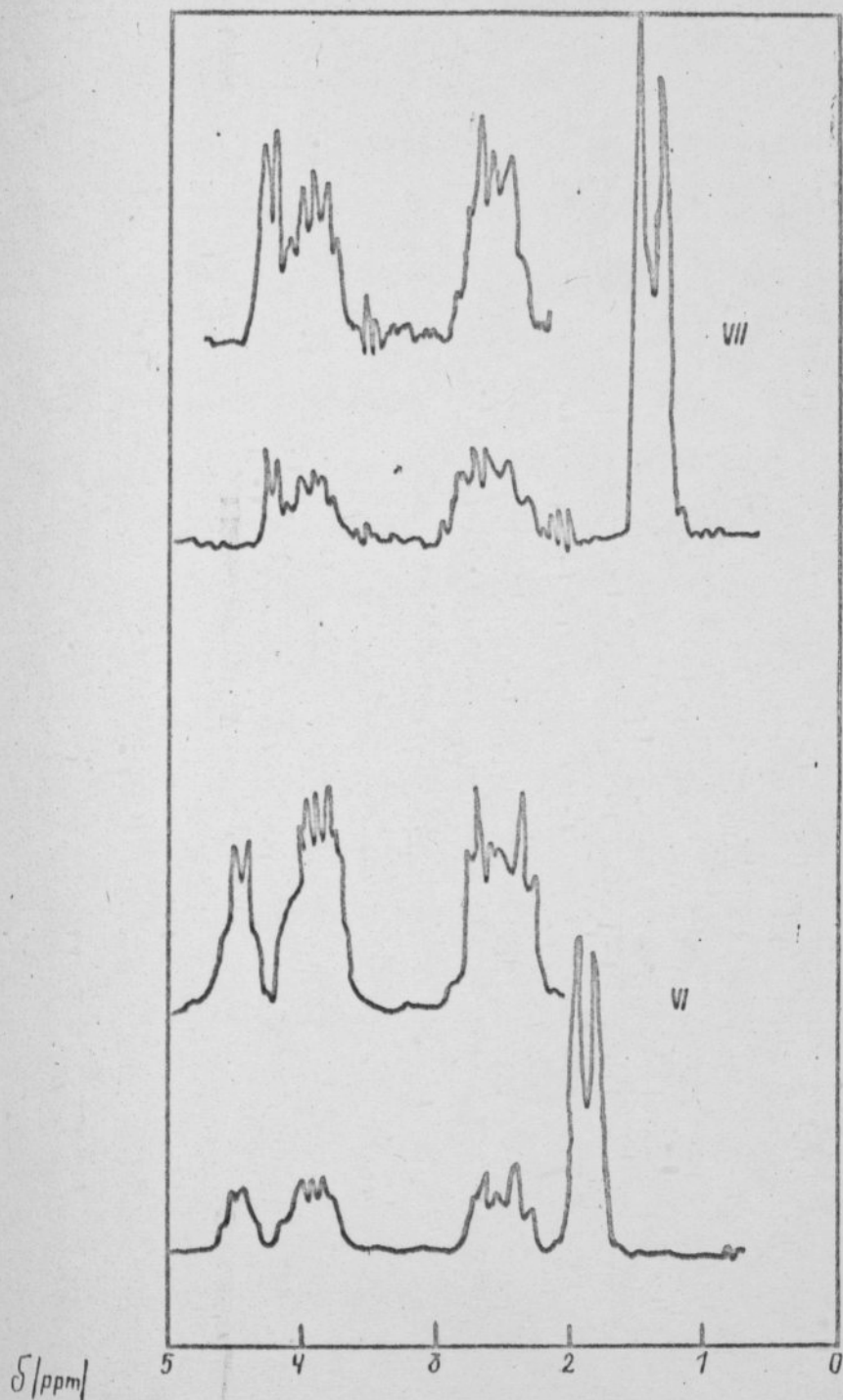
Drugi sygnał pochodzący od ciliatyny leży około 3,90 ppm i jest także układem dwóch trypletów gdzie stałe sprzężeń wynoszą: $J_{CH-CH} = 7,0$ Hz i $J_{PCCH} = 13,0$ Hz. Pozostałe sygnały odpowiadają resztom: alanylowej w związku /VI/ i walilowej w połączeniu /VII/.

W widmie alanylociliatyny /VI/ dublet o stałej sprzężenia 7,0 Hz leżący przy 1,91 ppm jest sygnałem grupy CH_3 , zaś kwartet / $J_{CH-CH} = 7,0$ Hz/ przy 4,47 ppm pochodzi od grupy CH.

W widmie walilociliatyny /VII/ też występuje dublet pochodzący od grup metylenowych leżący przy 1,42 ppm / $J_{CH-CH} = 7,0$ Hz/. Dublet przy 4,25 ppm jest sygnałem grupy CH związanej z atomem azotu / $J_{CH-CH} = 7,0$ Hz/.

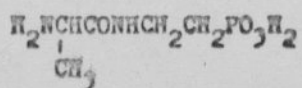


Rysunek 3. Widma protonowego rezonansu magnetycznego:
 -mieszanki glicyny i ciliałtyny /Gly+Cil/
 -glicylociliałtyny/Gly Cil - I/

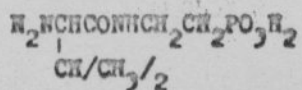


Rysunek 4. Widma protonowego nmr peptydów octylatyny:

-D,L-alanyloctylatyny /VI/



-D,L-valyloctylatyny /VII/

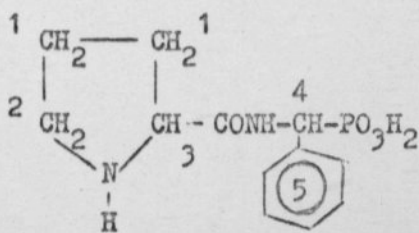


Na rysunku 5 podałem widma kwasu d,l-alanyloaminobenzylfosfonowego /VIII/ i kwasu N-l-proliiloaminobenzylfosfonowego /IX/. Widma te sporządzono w identycznych warunkach jak widma ciliatyny.

W obu widmach łatwo jest wyróżnić sygnały grup kwasu aminobenzylfosfonowego. Są to: singlet leżący przy 7,75 ppm pochodzący od protonów fenylowych oraz bardzo charakterystyczny dublet grupy CH około 5,5 ppm. Stała sprzężenia protonu tej grupy z fosforem wynosi 21,0 Hz. Inne sygnały pochodzą od protonów z N-końcowych aminokwasów fosfonopeptydu.

W widmie kwasu N-d,l-alanyloaminobenzylfosfonowego /VIII/ układ dwóch dubletów o stałych sprzężenia 7,0 Hz leżących przy 1,75 ppm i 1,90 ppm to sygnały grupy CH₃ d,l-alaniny. Obecność dwóch dubletów spowodowana jest tu istnieniem dwóch centrów asymetrii w cząsteczce peptydu /obie grupy CH/. Multiplet leżący między 4,0 a 4,7 ppm jest sygnałem protonu grupy CH reszty alanylowej.

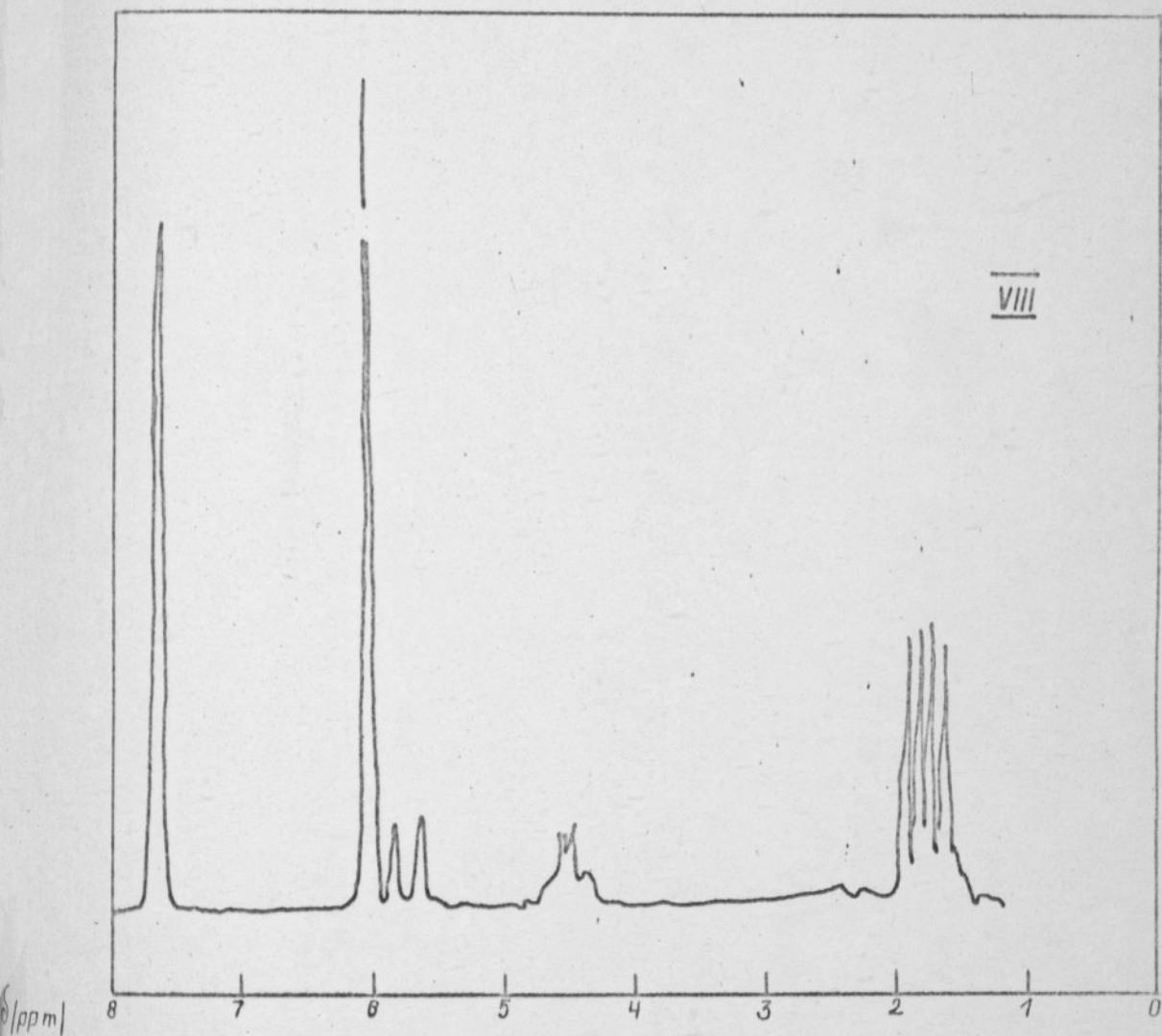
Widmo kwasu N-l-proliiloaminobenzylfosfonowego /IX/ jest oczywiście dużo bardziej skomplikowane. Aby je omówić ponumerowałem protony w cząsteczce tego peptydu w kolejności odpowiadającej pojawianiu się sygnałów w widmie nmr:



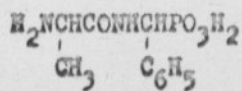
Szeroki, skomplikowany multiplet leżący między 1,8 a 3,0 ppm jest sygnałem dwóch grup metylenowych /1/ pierścienia proliny. Tryplet, który pojawia się w widmie przy 3,71 ppm jest sygnałem grupy metylenowej /2/ związanej z azotem w pierścieniu proliny, zaś drugi tryplet leżący przy 4,87 ppm pochodzi od grupy CH /3/ proliny. Stałe sprzężenia obu trypletów wynoszą po 7,0 Hz.

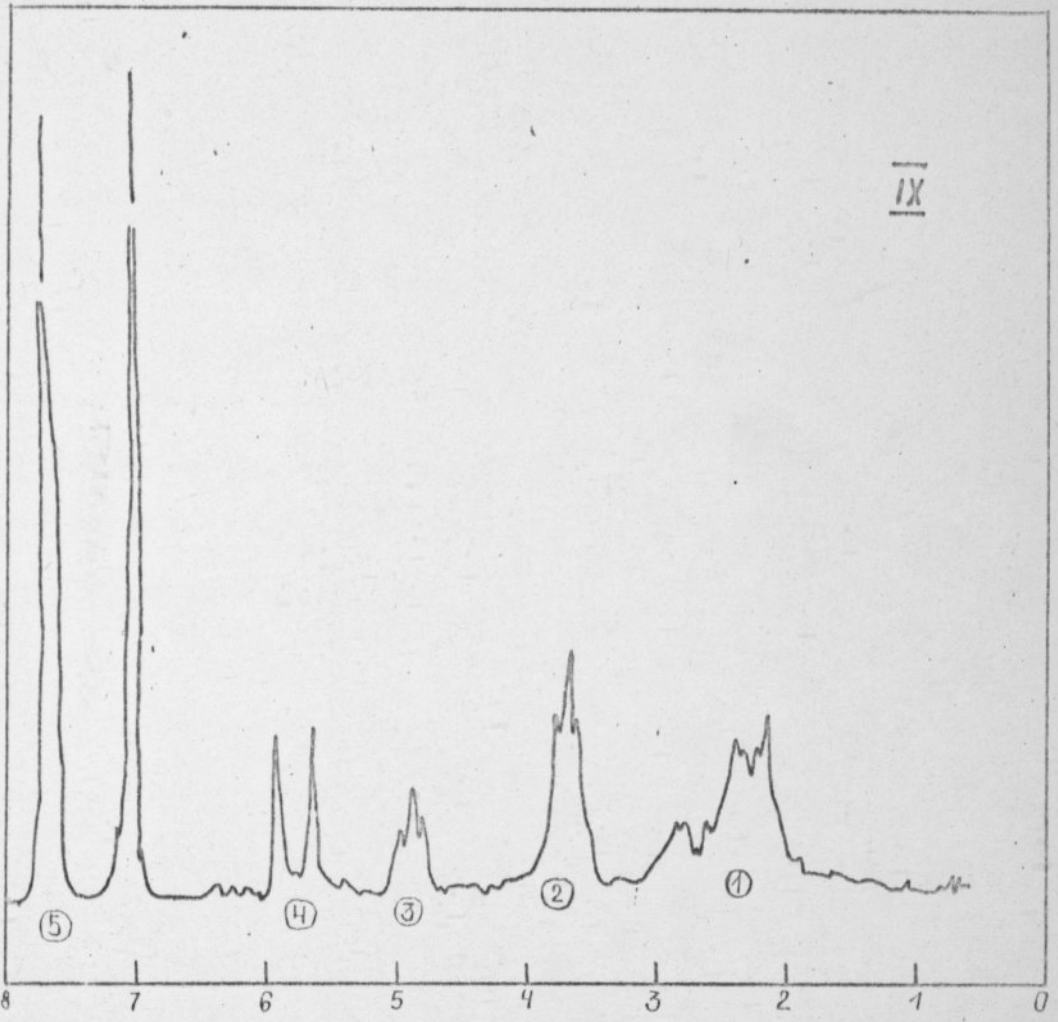
Protony oznaczone numerami /4/ i /5/ to odpowiednie, omówione wcześniej, sygnały P-końcowego kwasu aminobenzylfosfonowego.

Nie omawiam tu widm ftalilopeptydów albowiem w czasie pomiaru następuje rozpad cząsteczki zarówno gdy widma te sporządza się w kwaśnym jak i zasadowym

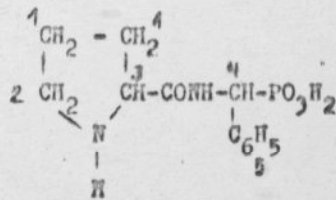


Rysunek 5 a. Widmo protonowego nmr kwasu d,l-alanyloaminobenzylfosfonowego /VIII/





Rysunek 5 b. Widmo protonowego rezonansu magnetycznego kwasu N-1-prolyl-L-fenylalaninobenzylfosfonowego:



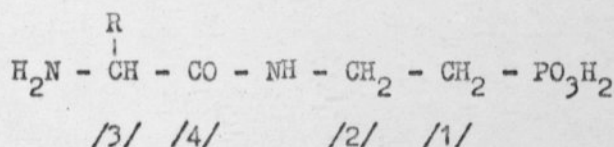
roztworze /stwierdziłem to przy pomocy C-13 nmr/

3.3.3. W i d m a C-13 nmr peptydów ciliatyny.

Węglowy rezonans magnetyczny stanowi dość czułą metodę określenia sposobu związania aminokwasów w peptydach. Sądząc, że metoda ta może okazać się przydatną w przyszłości do prób określenia sposobu, w jaki ciliatyna jest związana w białkach /aby wykonać te próby należałoby dysponować wszystkimi typami połączeń tego kwasu z aminokwasami i cukrami jakie mogą występować w glikoproteidach/ zmierzyłem widma C-13 nmr otrzymanych przeze mnie peptydów ciliatyny.

Otrzymane wyniki zebrałem w tabeli 1.

Tabela 1. Przesunięcia chemiczne i stałe sprzężeń w widmach C-13 nmr peptydów kwasu 2-aminoetylofosfonowego.



peptyd	R	przesunięcia chemiczne węgla				stała sprzężenia C ₁ -P
		/1/	/2/	/3/	/4/	
		w ppm				w Hz
glycyllociliatyna	H	29,5	37,0	42,1	162,0	127
d,l-alanyllociliatyna	CH ₃	29,7	37,0	67,4	148,8	126
d,l-walillociliatyna	CH/CH ₃ / ₂	29,2	36,9	61,5	147,0	122
l-leucyllociliatyna	CH ₂ CH/CH ₃ / ₂	29,9	37,0	54,2	145,9	126
l-fenylalanyllociliatyna	CH ₂ C ₆ H ₅	29,9	37,0	57,2	147,7	126
l-prolillociliatyna		28,5	36,1	60,7	154,7	131

Pomiary prowadziłem w roztworze NaOD w ciężkiej wodzie /nie utrzymując jednako-
wego pH we wszystkich próbkach/ wobec dioksanu jako wzorca wewnętrznego/.
Jedynie widmo l-prolillociliatyny mierzyłem w D₂O bez dodatku NaOD.

Położenie sygnałów węgla /1/ i /2/ jest bardzo stabilne i różnica przesunięć chemicznych dla różnych peptydów nie przekracza 1 ppm. Tak więc w P-terminalnych peptydach ciliatyny położenie sygnałów węgla tego aminokwasu nie jest zależne od rodzaju aminokwasu z jakim jest on związany. Jest to sytuacja analogiczna do występującej w przypadku kwasów aminokarboksylowych. Większe nieco odchylenia przesunięć ciliatynowych węgla /1/ i /2/ notuje się w widmie proliżociliatyny, ale wynikają one z faktu zastosowania innych warunków pomiaru widma / zastosowania wody zamiast zasady jako rozpuszczalnika/.

Położenie sygnałów węgla /3/ i /4/ aminokwasu N-końcowego zależy od budowy tego aminokwasu.

Położenie sygnału węgla /4/ wyraźnie wskazuje na istnienie wiązania peptydowego w badanych połączeniach.

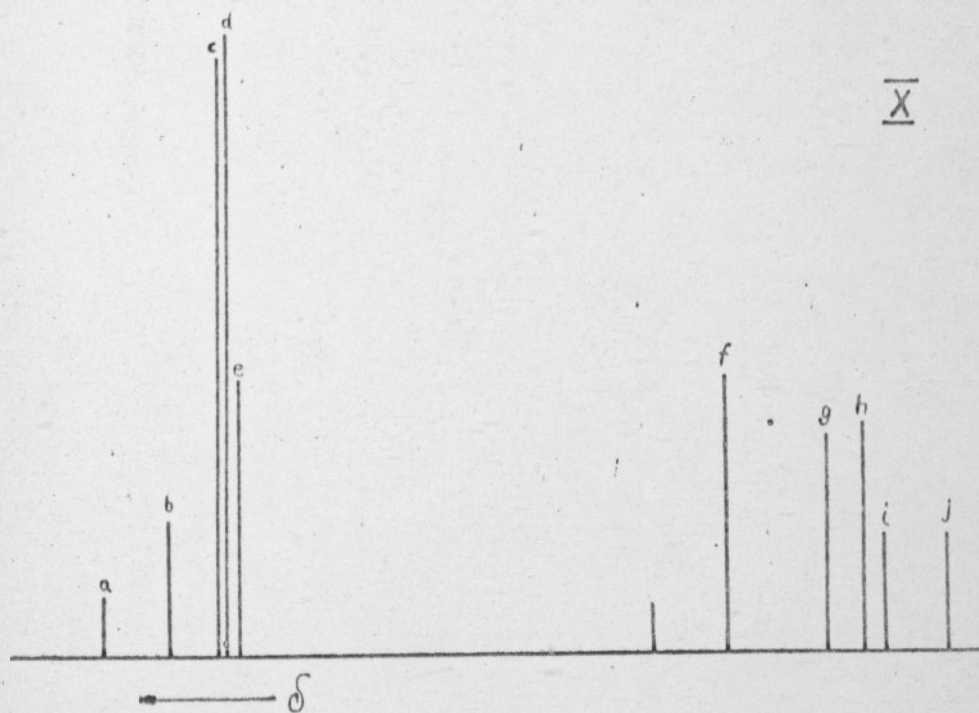
Obserwowane stałe sprzężenia C /1/ - P są charakterystyczne dla kwasów fosfonowych ²¹¹.

Na rysunku 6 podałem pełną interpretację widma l-fenylalaninociliatyny /X/ i l-leucynociliatyny /XI/.

3.4. Próba hydrolizy kwasów N-acetylo-aminoalkilofosfonowych pod wpływem acylazy nerkowej.

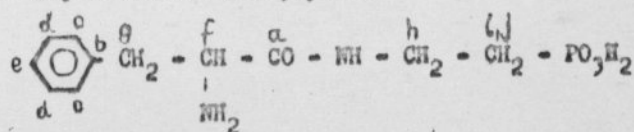
Przeprowadziłem próbę hydrolizy wiązania amidowego w kwasach N-acetylo-1-aminoalkilofosfonowych działając na nie acylazą nerkową. Ten niespecyficzny enzym dość łatwo zrywa wiązania amidowe w N-acetylowych pochodnych aminokwasów. Wydawało mi się, że powinien on działać podobnie na ich analogi fosfonowe.

Próbie tą traktowałem jako modelową reakcję rozpadu wiązania peptydowego w P-terminalnych peptydach fosfonowych. Przeprowadziłem ją używając pochodnych kwasów: aminometylofosfonowego /I/, 1-aminoetylofosfonowego /II/ i aminobenzylfosfonowego /III/. Przeprowadziłem też próbę kontrolną używając N-acetylo-D,L-waliny /IV/.



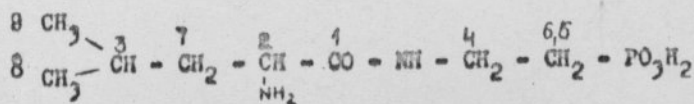
Rysunek 6. Widma C-13 nmr peptydów oślietyny:

-l-fenylalaninociliatyny /X/

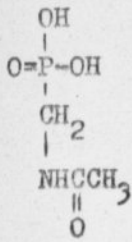


$$J_{P-C} = \delta_1 - \delta_j$$

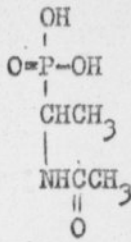
-l-leucociliatyny /XI/



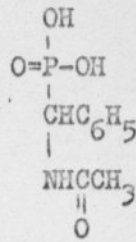
$$J_{P-C} = \delta_5 - \delta_6$$



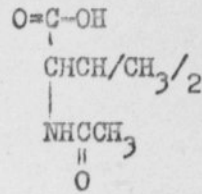
/I/



/II/



/III/



/IV/

Nie stwierdziłem przyrostu stężenia wolnych aminokwasów w badanych próbkach z czego można wyciągnąć wniosek, że acylaza nerkowa nie hydrolizuje wiązania peptydowego w badanych pochodnych fosfonowych. W próbie kontrolnej z N-acetylo-d,l-walinalą enzym wykazał pełną aktywność.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI.

W pracy niniejszej zbadalem przede wszystkim przydatność szeregu najczęściej stosowanych, klasycznych metod syntezy peptydów do otrzymywania P-terminalnych peptydów zarówno z wolnych kwasów aminofosfonowych jak i ich estrów.

Na podstawie uzyskanych wyników i danych literaturowych wyciągam następujące wnioski:

1./S y n t e z a peptydów fosfonowych z wolnych kwasów aminofosfonowych.

a./metodą Fischera można otrzymywać peptydy kwasów aminofosfonowych ze stosunkowo wysokimi wydajnościami ale jej zastosowanie jest ograniczone do najprostszych aminokwasów /to jest glicyny, alaniny czy β -alaniny/.

b./acylowanie soli kwasów aminofosfonowych w roztworach wodnych, chlorkami lub mieszanymi bezwodnikami karboksylowo-karbonowymi N-zablokowanych aminokwasów prowadzi do otrzymania z dobrymi wydajnościami peptydów glicyny, alaniny i β -alaniny jako kwasów N-końcowych. Próby zastosowania tych metod do otrzymania innych peptydów zakończyły się niepowodzeniem a więc nie są to, wbrew doniesieniom literaturowym, metody ogólne.

c./najlepszą metodą otrzymywania peptydów z wolnych kwasów aminofosfonowych jest metoda aktywnych estrów. Zastosowane w mojej pracy estry para- i orto-nitrofenylowe ftaliloaminokwasów nie zostały wybrane zbyt szczęśliwie gdyż wydzielanie produktów reakcji jest niesłychanie trudne. Wydaje się, że poszukiwania lepszych grup blokujących i zastosowanie innych estrów może dać bardziej obiecujące wyniki.

W konkluzji wydaje się, że wolne kwasy aminofosfonowe nie są dobrymi substratami w syntezie ich P-końcowych peptydów i dużo większe możliwości stwarza zasto-

owanie estrów dwualkilowych tych aminokwasów.

2./Synteza peptydów z estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych.

a./satisfakcjonującą metodą, dającą żądane połączenia ze stosunkowo dobrymi wydajnościami jest metoda mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych. Metodą tą otrzymałem szereg nowych peptydów ciliatyny oraz kwasów aminobenzylfosfonowego i 1-amino-2-metylopropanofosfonowego wychodząc zarówno z karbobenzoksyaminokwasów jak i ftaliloaminokwasów. Według mnie jest to najlepsza z zastosowanych dotychczas metod syntezy P-terminalnych peptydów fosfonowych.

b./uznawana w literaturze za ogólną metoda DCC nie daje dobrych wyników dla wszystkich estrów kwasów aminofosfonowych. Metodą tą otrzymałem jedynie kilka peptydów kwasu aminobenzylfosfonowego, gdy substratami reakcji były karbobenzoksyaminokwasy i aminobenzylfosfoniany dwualkilowe. Już zastosowanie ftaliloaminokwasów i tych samych estrów prowadzi do otrzymania mieszaniny produktów przy czym głównymi są produkty reakcji ubocznej czyli odpowiednie N-acylowane dwucykloheksylomoczniki. Stosując estry ciliatyny i kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego otrzymywałem także odpowiednie moczniki zanieczyszczone pożądanym produktem.

c./opracowana przez Gilmore'a i Mc Bride'a ¹⁴⁹ metoda usuwania reszty estrowej blokującej grupę fosfonową w reakcji bromowodorolizy 40% HBr w kwasie octowym nie prowadzi do pełnego usunięcia reszt blokujących w warunkach podanych przez tych badaczy. Pożądany produkt zanieczyszczony jest monoestrem /produktem niezupełnego odblokowania/ co utrudnia wydzielenie peptydów fosfonowych w stanie czystym. Podwyższenie temperatury tej reakcji do 50-60°C powoduje, że przebiega ona do końca.

3./Spektroskopowe badania peptydów fosfonowych.

Opisałem dość szczegółowo widma w podczerwieni oraz protonowego i węglowego rezonansu magnetycznego otrzymanych połączeń. Podczerwień jest bardzo dobrą metodą stwierdzenia utworzenia się wiązania peptydowego oraz dobrą metodą identyfikacji P-końcowych peptydów fosfonowych. Natomiast protonowy rezonans magnetycz-

czny nie daje zbyt wiele informacji na temat budowy tych połączeń gdyż widma peptydów są niemal identyczne z widmami równomolowych mieszanin aminokwasów będących składnikami tych peptydów. Mierząc widma C-13 nmr otrzymanych przeze mnie peptydów ciliatyny miałem na uwadze fakt, że metoda ta może się okazać użyteczną przy identyfikacji sposobu wiązania tego kwasu w glikoproteidach. Sygnały obu węgla ciliatyny w widmach C-13 nmr leżą niezmiennie w tym samym punkcie widma i ich położenie nie jest zależne od budowy N-końcowego aminokwasu peptydu.

4./Badania enzymatyczne.

Przeprowadziłem próbę hydrolizy wiązania amidowego w kwasach N-acetyloaminoalkilofosfonowych działając na nie acylazą nerkową. Ten wielce niespecyficzny enzym nie zrywa wiązania amidowego w tych pochodnych. Próbę tą traktowałem jako modelową reakcję enzymatycznego rozpadu wiązania peptydowego w P-terminalnych peptydach fosfonowych.

5./Synteza estrów kwasów aminofosfonowych.

Trudna dostępność estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych zmusiła mnie do opracowania metody otrzymywania tych połączeń. Nieco zmodyfikowałem patentową metodę otrzymywania estrów ciliatyny z cyjanometylofosfonianu dwuetylowego oraz opracowałem w miarę prostą i ogólną metodę syntezy estrów dwuizopropylowych kwasów aminofosfonowych. Polega ona na przyłączeniu fosforynów do odpowiednich zasad Schiffa, wydzieleniu otrzymanych produktów w postaci chlorowodoroków i hydrogenolityczne usunięcie reszty blokującej azot. Opracowana przeze mnie metoda jest jedną z lepszych i prawdopodobnie najprostszą metodą otrzymywania chlorowodoroków estrów kwasów aminofosfonowych.

Z szeregu problemów podjętych w mojej pracy, tylko niektóre można uznać za wyczerpane w dostatecznym stopniu w związku z czym nasuwa się generalny wniosek o konieczności kontynuowania niektórych badań zasygnalizowanych w mojej pracy. Do nich można zaliczyć przede wszystkim:

a./próby zaadaptowania innych metod syntezy peptydów do otrzymania fosfopeptydów z P-końcowym kwasem aminofosfonowym. Szczególnie interesującym wydaje się

być zastosowanie w tym celu najbardziej popularnej ostatnio metody acylowania estrów aminokwasów azydkami N-zablokowanych aminokwasów.

b./opracowanie metod selektywnego usuwania grup blokujących zarówno P- jak i N- koniec peptydów fosfonowych. Wiąże się to z wypróbowaniem większej ilości grup blokujących i różnych warunków ich usuwania.

c./opracowanie dobrych i skutecznych metod wprowadzania grup chroniących azot i resztę fosfonową w aminokwasach i otrzymanych peptydach. Najpilniejszym zadaniem jest tu znalezienie prostej, bezpośredniej metody estryfikacji kwasów aminofosfonowych.

d./otrzymanie substratów mogących posłużyć jako wzorce do określenia sposobu wiązania ciliatyny w glikoproteidach. Substratami takimi są fosfonopeptydy zawierające wiązanie P-N, oraz peptydy których reszta fosfonowa związana jest z cząsteczką cukru wiązaniem estrowym lub fosfonamidowym.

e./przeprowadzenie badań zachowania się otrzymanych peptydów w reakcjach enzymatycznych a szczególnie zbadanie ich zachowania się wobec peptydaz. Ma to tym bardziej duże znaczenie, że dwa najnowsze antybiotyki fosfonowe są peptydami aminokwasów fosfonowych.

Większość z nakreślonych tu przeze mnie problemów została lub zostanie wkrótce podjęta w naszej grupie badawczej.

5. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.

5.1. Aparatura i stosowane metody analityczne.

5.1.1. Temperatury topnienia /niekorygowane/ oznaczalem na stoliku Boetiusa firmy KRANZ KUSTNER NACHT.KG.

5.1.2. Widma w podczerwieni zostały wykonane przez Centralne Laboratorium Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej przy pomocy aparatów ZEISS UR-10 oraz PERKIN ELMER model 621.

5.1.3. Widma protonowego rezonansu magnetycznego wykonywano w pracowni NMR Centralnego Laboratorium Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej przy pomocy aparatu TESLA 80 MHZ oraz w pracowni Wydziału Chemicznego Marquette University /Wisconsin, USA/ przy pomocy aparatu VARIAN A-60.

5.1.4. Widma C-13 nmr mierzyłem w pracowni Wydziału Chemicznego Marquette University na aparacie JEOL 60 MHZ z akumulacją sygnału.

5.1.5. Analizy elementarne były wykonywane przez pracownię analizy elementarnej Centralnego Laboratorium Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej.

5.1.6. Chromatografię gazową wykonywano w pracowni chromatografii gazowo-cieczowej Centralnego Laboratorium Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej, przy pomocy aparatu GCHF-18/2 firmy GLEDE.

5.1.7. Pomiar kolorymetryczny wykonywałem przy pomocy aparatu firmy SHAGHAI ANAL.INSTR.NFR model 581.

5.1.8. Skład otrzymanych peptydów potwierdzałem poddając je hydrolizie przez ogrzewanie do wrzenia w ciągu 18 godzin w stężonym kwasie solnym i określanie ich składu aminokwasowego przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej.

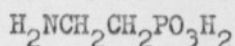
Chromatogramy sporządzałem używając płytek z żelu krzemionkowego MERCK 60 F₂₅₄ i układu kwas octowy-pirydyna-woda /1:19:3/ jako eluenta. Planki odpowiadające położeniu peptydów i aminokwasów wywoływałem używając 0,5% roztworu ninhydryny w etanolu.

5.1.9. Skręcalność mierzyłem polarymetrem kołowym firmy KARL ZEISS JENA z dokładnością 0,05°.

5.2. Synteza P-terminalnych peptydów fosfonowych z wolnych kwasów aminofosfonowych.

5.2.1. Synteza kwasu 2-aminoetylofosfonowego.

Ciliatynę otrzymany-



wałem metodą Ba-

ryckiego i wsp. 192, 193 przez przyłączenie fosforynu dwuetylowego do akrylamidu, degradację Hoffmanna otrzymanego produktu, a następnie hydrolizę kwasem solnym przez 12 godzin.

Wydajność 60% ; t. top. = 280-2°C / lit. t. top. = 278-80°C/

ir/KBr/: 1220/PO/

nmr/D₂O+D₂SO₄, HMDSz/: 2,64 ppm/t-t; 2p; J_{H-H} = 7,0; J_{PCH} = 18,0; CH₂P/ ;

3,72 ppm/t-t; 2p; J_{H-H} = 7,0; J_{PCCH} = 9,0; CH₂N/

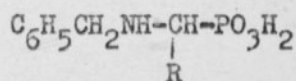
analizy dla C₂H₈NO₃P /125/ - obl.: 11,20% N; 24,80% P;

znal.: 11,13% N; 24,69% P.

5.2.2. Synteza kwasów 1-aminoalkilofosfonowych.

5.2.2.1. Synteza kwasów N-benzyl-1-aminoalkilofosfonowych.

Wybrane kwasy N-benzy-



lo-1-aminoalkilofosfo-

nowe otrzymywałem meto-

dą Tyki¹⁹⁴ dokonując nieznacznych modyfikacji polegających na wydzie-

laniu wolnego kwasu tlenkiem propylenu z alkoholowego roztworu jego chlorodorku. Tak otrzymałem:

-kwas N-benzylaminobenzylfosfonowy /R=C₆H₅/

wydajność 58% ; t. top. = 236-7°C / lit. t. top. = 236-7°C/

ir/KBr/: 3400/NH⁺; 1215/PO/

analizy dla C₁₄H₁₆NO₃P /277/ - obl.: 5,05% N; 11,19% P;

znal.: 5,11% N; 10,95% P.

-chlorowodorek kwasu N-benzyl-1-amino-2-metylopropanofosfonowego

/R=CH/CH₃/₂/ - nierozpuszczalny w etanolu.

wydajność 56% ; t.top.= 208-10°C

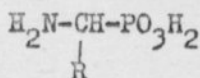
ir/KBr/:3420/NH⁺/;1220/PO/

analizy dla C₁₁H₁₉ClNO₃P /242,5/ - obl.: 5,01% N;11,09% P;

znal.: 5,22% N;10,90% P.

5.2.2.2.S y n t e z a kwasów 1-aminoalkilofosfonowych.

0,1 M kwasu N-benzyl-



1-aminoalkilofosfonowe-

go, lub lepiej jego chlorowodorku /reakcja idzie wtedy szybciej/ zawieszającym lub rozpuszczającym w lodowatym kwasie octowym, dodawałem około 1 g katalizatora /30% pallad na węglu aktywnym/ i traktowałem wodorem w temperaturze pokojowej pod normalnym ciśnieniem tak długo aż użyta została teoretycznie potrzebna ilość wodoru. Z otrzymanej mieszaniny usuwałem katalizator przez odsączenie i z filtratu usuwałem rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej. Oleistą pozostałość rozpuszczałem w etanolu /a gdy używałem do redukcji kwasu zawieszałem w etanolu i wysycałem chlorowodorem aż do rozpuszczenia osadu/ i wolny aminokwas wytrącałem przez dodanie tlenku propylenu lub pirydyny. Produkt oczyszczałem krystalizując z mieszaniny etanol-woda /1:1/.

W tej reakcji otrzymałem:

-kwas aminobenzylfosfonowy /R=C₆H₅/

wydajność 89% ; t.top.= 293-4°C /lit.t.top.= 280-2°C/

ir/KBr/: 3400, 1700, 1620, 1535/NH₃⁺/, 1190/PO/

analizy dla C₇H₁₀NO₃P /187/ - obl.: 7,49% N;16,58% P;

znal.: 7,50% N;16,80% P.

-kwas 1-amino-2-metylopropanofosfonowy /R=CH/CH₃/₂/

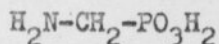
wydajność 83% ; t.top.= 273-4°C /lit.t.top.= 274°C/

ir/KBR/:1635,1600,1535/NH₃⁺/,1175/PO₃H⁻/

analizy dla $C_4H_{12}NO_3P$ /153/ - obl.: 9,15% N; 20,26% P;
znal.: 8,89% N; 19,98% P.

5.2.2.3. S y n t e z a Kwasu aminometylofosfonowego.

Kwas aminometylofosfo-
nowy otrzymywałem meto-



dą opisaną w literaturze ¹⁹⁵.

Wydajność 63% ; t.top. = 302-4°C /lit. t.top. = 306-7°C/
ir/KBr/: 1645, 1620, 1525/ NH_3^+ /; 1170/ PO_3H^- /

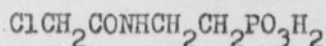
analizy dla CH_6NO_3P /111/ - obl.: 12,61% N; 27,93% P;
znal.: 12,83% N; 27,89% P.

5.2.3. Otrzymywanie glicylociliatyny metodą Fischera.

5.2.3.1. S y n t e z a N-chloroacetylociliatyny.

5.2.3.1.1. Acylowanie ciliatyny chlorkiem kwasu chlorooctowego.

Do roztworu 7,5 g

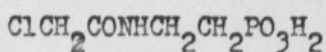


/0,06 M/ kwasu 2-ami-

noetylofosfonowego w 200 ml wody dodawałem 6,8 g /0,17 M/ tlenku magnezu, a następnie porcjami 7 ml chlorku kwasu chlorooctowego. Dodawanie chlorku trwało 45 minut po czym otrzymaną zawiesinę mieszałem dodatkowo 15 minut, zakwaszałem stężonym kwasem solnym do pH około 1 i zostawiałem na pół godziny w lodówce. Po przesączeniu otrzymany roztwór poddawałem rozdzielowi na kolumnie wypełnionej kationitem KPS /forma H^+ /. Zbierałem pierwszą frakcję kwaśną wycieku kontrolując rozdział pomiarem pH /papierkiem wskaźnikowym/ i współczynnika załamania światła. Z zebranej frakcji usuwałem rozpuszczalnik na wyparce obrotowej, pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując 8,2 g /co stanowi 68% wydajności/ gęstego oleju, który od razu poddawałem amonolizie.

5.2.3.1.2. Acylowanie ciliatyny bezwodnikiem kwasu chlorooctowego.

Mieszaninę 8,0 g

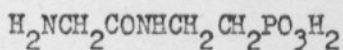


/0,047 M/ bezwodnika

kwasu chlorooctowego i 0,5 g /0,004 M/ ciliatyny ogrzewałem przez 6 godzin na wrzącej łaźni wodnej. Jednorodną mieszaninę po reakcyjną rozpuszczałem w 35 ml etanolu, wytrząsałem z węglem aktywnym, sączyłem i z filtratu usuwałem rozpuszczalnik pod próżnią pompki wodnej. Pozostałość ekstrahowałem kilkakrotnie dwudziestomililitrowymi porcjami eteru dwuetylowego otrzymując 0,45 g /wydajność 50%/ oleistego produktu.

5.2.3.1.A m o n o l i z a N-chloroacetylociliatyny, synteza glicylociliatyny.

6,0 g /0,03 M/ N-chloro-



acetylociliatyny rozpuści-

łem w 100 ml 25% wodnego roztworu amoniaku i zostawiałem na 10 dni w temperaturze pokojowej. Wówczas usuwałem rozpuszczalnik na wyparce obrotowej, otrzymaną pozostałość wytrząsałem z 50 ml etanolu i mieszaninę zakwasiłem do pH około 1 stężonym kwasem solnym. Mieszaninę tak otrzymaną zostawiałem w lodówce na pół godziny, usuwałem z niej wytrącony chlurek amonu odsączając go i do filtratu wolno dodawałem 10 ml pirydyny otrzymując w rezultacie białe kryształy produktu. Otrzymany osad rozpuszczałem w 50 ml wody, sączyłem i dodawałem na gorąco ok. 120 ml metanolu. Strącały się białe kryształy, które zbierałem na sączku i suszyłem. Otrzymałem 4,3 g /wydajność 79%/ produktu o t. top. = 270°C, rozkł.

Dane fizykochemiczne glicylociliatyny podałem w tabeli 1.

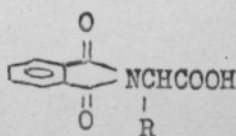
5.2.4. Acylowanie kwasów aminofosfonowych chlorkami ftaliloaminokwasów.

5.2.4.1. S y n t e z a ftaliloaminokwasów.

Ftaliloaminokwasy otrzy-

mywałem przez stapianie

bezwodnika ftalowego z aminokwa-



sami metodami podanymi w literaturze ¹⁹⁶.

W ten sposób otrzymałem:

-ftaliloglicynę /R=H/ - wyd.85% ; t.top.=191-3°C /lit.t.top.=192-4°C/

-ftalilo-d,l-alaninę /R=CH₃/ - wyd.79% ; t.top.=157-8°C /lit.t.top.=
=160-1°C/

-ftalilo-l-alaninę /R=CH₃/ - wyd.80% ; t.top.=148-9°C /lit.t.top.=151°C/

-ftalilo-l-fenylalaninę /R=CH₂C₆H₅/ - wyd.78% ; t.top.=179-80°C
/lit.t.top.=183-5°C/

-ftalilo-l-leucynę /R=CH₂CH/CH₃/₂/ - wyd.75% ; t.top.=114-6°C
/lit.t.top.=118,5-9,5°C/

-ftalilo-d,l-walinę /R=CH/CH₃/₂/ - wyd.69% ; t.top.=101-3°C/lit.t.top.=
101,5-102°C/

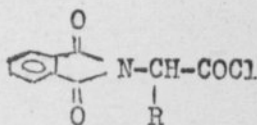
-ftalilo-β-alaninę - wyd.89% ; t.top.=149-50°C /lit.t.top.=150°C/

5.2.4.2.S y n t e z a Chlorków ftaliloaminokwasów.

Clorki ftaliloaminokwasów

/R=H, CH₃CH₂C₆H₅, CH/CH₃/₂,

CH₂CH/CH₃/₂/ otrzymywałem



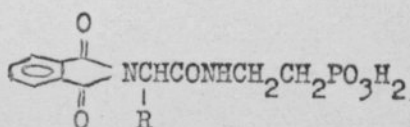
działając pięciochlorkiem fosforu na ftaliloaminokwasy w suchym benzenie, według przepisu podanego w literaturze ¹⁹⁷. Produktu nie oczyszczałem ale po rozpuszczeniu w suchym dioksanie używałem w reakcji acylowania kwasów aminofosfonowych.

5.2.4.3.A c y l o w a n i e kwasu 2-aminoetylofosfonowego chlorkami ftaliloaminokwasów.

Do schłodzonej na

łażni lodowo-wodnej

zawiesiny 4,8 g /0,12 M/



tlenku magnezu w 200 ml wody dodawałem 5,0 g /0,04 M/ ciliatyny i następnie wolno wkraplałem, energicznie mieszając, roztwór 0,04 M chlorku ftali-

loaminokwasu w 70 ml suchego dioksanu. Otrzymaną mieszaninę reakcyjną mieszano dodatkowo przez trzy godziny w temperaturze 0 - 5°C poczym zakwaszałem stężonym kwasem solnym do pH około 1. Po usunięciu wytrąconego ftaliloaminokwasu przez odsączenie go otrzymany roztwór przepuszczalem przez kolumnę wypełnioną kationitem KPS /forma kwaśna/ myjąc kolumnę wodą. Zbierałem pierwszą kwaśną frakcję wycieku kontrolując przebieg rozdzielania pomiarem współczynnika załamania światła i pH /papierek wskaźnikowy/. Po usunięciu rozpuszczalnika na wyparce obrotowej, pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymywałem stałą pozostałość, którą wytrząsałem z 20 ml etanolu otrzymując krystaliczne produkty, których dane fizykochemiczne umieściłem w tabeli 2.

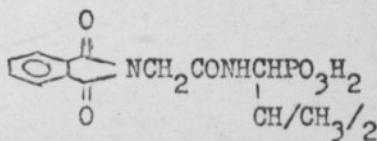
Metodą tą otrzymałem:

- ftaliloglicylociliatynę /R=H/ z wydajnością 65%
- ftalilo-d,l-alanylociliatynę /R=CH₃/ z wydajnością 55%.

Otrzymanej ftalilo-l-fenylalaniny nie wydzielałem, ale surową poddawałem hydrazynolizie otrzymując l-fenylalaninociliatynę.

5.2.4.4. A c y l o w a n i e kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego chlorkiem ftaliloglicyny.

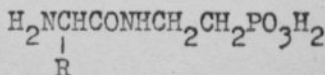
Kwas N-glicylo-1-amino-2-metylopropanofosfonowy otrzymywałem



w sposób identyczny jak w punkcie 5.2.4.3. Dane fizykochemiczne tego połączenia zamieściłem w tabeli 2. Wydajność reakcji 63%.

5.2.4.5. O t r z y m y w a n i e peptydów ciliatyny przez hydrazynolizę ich N-ftalilowych pochodnych.

0,02 M N-ftalilopeptydu rozpuszczałem w 150 ml



etanolu i do tak otrzymanego roztworu dodawałem 2,0 ml /0,07 M/ bezwod-

nej hydrazyny /można też używać odpowiednio większej ilości 80% wodzianu hydrazyny I. Roztwór ogrzewałem do wrzenia przez godzinę i zostawiałem na noc w temperaturze pokojowej. Wytrącony osad sączyłem, ekstrahowałem go 50 ml 2N kwasu solnego /ogrzewając przez 10 min. w 50-60°C/ i sączyłem w celu usunięcia hydrazynu kwasu ftalowego. Z otrzymanego filtratu usuwałem rozpuszczalnik na wyparce obrotowej, pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość wytrząsałem z 60 ml etanolu. Po usunięciu niewielkiej ilości zanieczyszczeń przez sączenie wytrącałem wolny peptyd przez dodanie pirydyny /dodawałem pirydyny tyle aż pH mieszaniny osiągnęło wartość 6/. Wytrącony, surowy peptyd oczyszczałem przez krystalizację z etanolu-wody /1:2/ otrzymując:

-glicylociliatynę /R=H/ z wydajnością 80%

-d,l-alanylociliatynę /R=CH₃/ z wydajnością 85%

W identyczny sposób otrzymywałem l-fenylalanylociliatynę /R=CH₂C₆H₅/ z wydajnością 6% w przeliczeniu na użyty kwas 2-aminoetylofosfonowy.

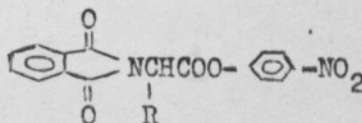
Dane fizykochemiczne produktów zebrałem w tabeli 1.

5.2.5. Synteza P-końcowych peptydów fosfonowych metodą aktywnych estrów para- i orto-nitrofenylowych.

5.2.5.1.0 t r z y m y w a n i e estrów p- i o-nitrofenylowych ftaliloaminokwasów.

Estry para- lub

orto-nitrofenylowe



ftaliloaminokwasów prepa-

rowałem w sposób podany przez Greensteina i Winitza ¹⁹⁸. Tak otrzymałem:

-ester p-nitrofenylowy ftaliloglicyny /R=H/ - wyd. 85% ; t. top. 178-180°C

/lit. t. top. = 180-181,5°C/

-ester o-nitrofenylowy ftaliloglicyny /R=H/ - wyd. 80% ; t. top. = 172-4°C

/lit. t. top. = 170-2°C/

-ester p-nitrofenylowy ftalilo-d,l-alaniny /R=CH₃/ - wyd. 84% ; t. top. =

=125-7°C/lit.t.top.=127°C/

-ester o-nitrofenylowy ftalilo-d,l-alaniny /R=CH₃/ - wyd.81% ; t.top.=
=128-130°C

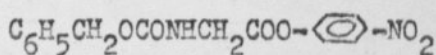
-ester p-nitrofenylowy ftalilo-l-fenylalaniny /R=CH₂C₆H₅/ - wyd.76% ;
t.top.=178-80°C

- ester p-nitrofenylowy ftalilo-l-leucyny /R=CH₂CH/CH₃/₂/ - wyd.78% ;
t.top.=82-3°C /lit.t.top=82°C/

-ester p-nitrofenylowy ftalilo-β-alaniny - wyd.69% ; t.top.=152-4°C.

5.2.5.2.0 t r z y m y w a n i e estru p-nitrofenylowego karbobenzoksyglicyny.

Ester ten otrzymywa-

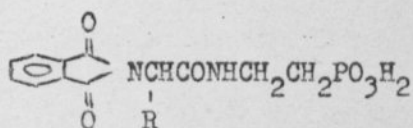


łem w sposób podany przez

Greensteina i Winitza ¹⁹⁸. Uzyskałem w ten sposób produkt o t.top.=127-30°C
/lit.t.top.=128°C/ z wydajnością 87%.

5.2.5.3.A o c y l o w a n i e ciliatyny przy pomocy estów p- i o-nitrofenylowych ftaliloaminokwasów.

0,005 M estru para-



lub orto-nitrofenylo-

wego ftaliloaminokwasu

rozpuszczałem w ciepłym roztworze 15 ml dioksanu i 5 ml wody, a następnie
dodawałem 0,62 g ciliatyny /0,005 M/. Mieszanie reakcyjną ogrzewałem
do wrzenia dodając porcjami, w przeciągu 10-15 minut, 1,5 ml trójetylo-
aminy. Mieszanie ogrzewałem dodatkowo przez 15-30 minut, aż nastąpiło cał-
kowite rozpuszczenie aminokwasu. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej
dodawałem 25 ml wody i zakwaszałem stężonym kwasem solnym do pH około 1.
Otrzymany roztwór zostawiałem na noc w lodówce. Zazwyczaj strącał się
osad, który sączyłem i suszyłem. Jeśli osad się nie pojawiał to usuwałem
rozpuszczalnik na wyparce obrotowej, do pozostałości dodawałem wody
i ponownie zostawiałem w lodówce. Otrzymany osad sączyłem i suszyłem
/gdy pojawiał się olej, dekantowałem ciecz z nad nim, a pozostałość

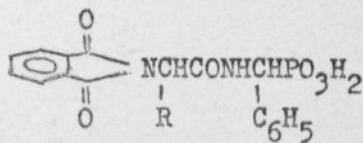
poddawałem reakcji hydrazynolizy/. Uzyskany tak osad wytrząsałem dwukrotnie z dwudziestoma mililitrami octanu etylu / celem odmycia powstałego w reakcji nitrofenolu, który współwytrąca się częściowo z produktem/, sączyłem i produkt krystalizowałem z etanolu lub mieszaniny etanol-woda. Tak otrzymywałem:

- ftaliloglicylociliatynę /R=H/ z wydajnością 46%
- ftalilo-d,l-alanylociliatynę /R=CH₃/ z wydajnością 43%
- ftalilo-l-fenylalanylociliatynę /R=CH₂C₆H₅/ z wydajnością 70%.

Dane fizykochemiczne produktów podałem w tabeli 1.

5.2.5.4. A c y l o w a n i e kwasu aminobenzylfosfonowego estrami orto- i para-nitrofenylowymi ftaliloaminokwasów.

Pożądanę ftalilo-peptydy otrzymywałem identycznie

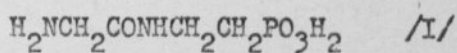


jak w punkcie 5.2.5.3. wychodząc z 0,005 M estru nitrofenylowego ftaliloaminokwasu i 0,94 g /0,005 M/ kwasu aminobenzylfosfonowego. Tak otrzymałem produkty, których dane fizykochemiczne podaję w tabeli 1, a mianowicie:

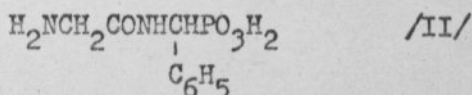
- kwas N-ftaliloglicyloaminobenzylfosfonowy /R=H/ z wydajnością 56%
- kwas N-ftalilo-β-alanyloaminobenzylfosfonowy z wydajnością 43%

5.2.5.5. A c y l o w a n i e kwasów aminofosfonowych estrem p-nitrofenylowym karbobenzoksyglicyny.

1,65 g /0,005 M/ estru



p-nitrofenylowego kar-



bobenzoksyglicyny roz-

puszczałem w gorącym roz-

tworze 15 ml dioksanu i 5 ml wody i dodawałem 0,62 g ciliatyny /0,005 M/

lub 0,94 g /0,005 M/ kwasu aminobenzylfosfonowego. Wówczas w ciągu 15 mi-

nut dodawałem 1,5 ml trójetyloaminy obserwując rozpuszczanie się kwasu aminofosfonowego. Dla zakończenia reakcji, otrzymany roztwór ogrzewałem jeszcze przez pół godziny w temperaturze wrzenia, studziłem do temperatury pokojowej i zakwaszałem stężonym kwasem solnym do pH około 1. Z otrzymanego roztworu usuwałem rozpuszczalnik na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość wytrząsałem z 30 ml wody i produkt ekstrahowałem do octanu etylu. Wartwę octanową suszyłem bezwodnym siarczanem magnezu i po usunięciu środka suszącego usuwałem rozpuszczalnik. Otrzymaną oleistą pozostałość rozpuszczałem w 5 ml 40% HBr w lodowatym kwasie octowym i pozostawiałem na godzinę w temperaturze pokojowej. Wówczas usuwałem rozpuszczalnik i nadmiar bromowodoru pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej, pozostałość rozpuszczałem w metanolu i znów odparowywałem rozpuszczalnik. Otrzymany w rezultacie olej rozpuszczałem w 20 ml etanolu, wytrząsałem ze szczyptą węgla aktywnego aby usunąć brunatne zabarwienie roztworu, sączyłem od węgla aktywnego i z filtratu strącałem produkt pirydyną. Otrzymane kryształy produktu oczyszczałem przez krystalizację z roztworu woda-aceton. Tak otrzymałem:

-glicylociliatynę /I/ z wydajnością 33%

-kwas N-glicyloaminobenzylfosfonowy /II/ z wydajnością 36%.

5.2.6. Synteza peptydów fosfonowych z wolnych kwasów aminofosfonowych metoda mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych.

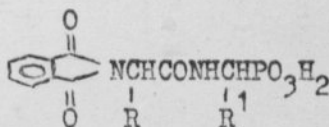
W 20 ml dioksanu

zawierającego 1,5 ml

trójetyloaminy roz-

puszczałem 0,01 M ftaliloaminokwasu i po ochłodzeniu w łaźni lodowo-wod-

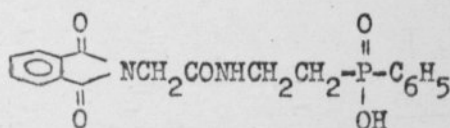
nje dodawałem 1,0 ml /0,011 M/ chloromrówczanu etylu. Tak otrzymany roztwór



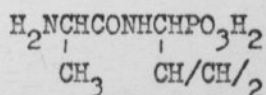
zostawiałem w łaźni na 25 minut i wówczas dodawałem roztwór 0,01 M kwasu aminofosfonowego w 10ml wody zawierającej 1,0 g bezwodnego węgla sodu. Mieszaninę tak otrzymaną mieszałem w temperaturze pokojowej przez trzy godziny, zakwaszałem do pH około 1 stężonym kwasem solnym i zostawiałem w lodówce na noc. Usuwałem stracony chlorek sodu a otrzymany roztwór rozcieńczyłem dodając 30-30 ml wody i zostawiałem w lodówce na noc. Wytrącają się białe kryształy produktu, które zbierałem i krystalizowałem z etanolu lub mieszaniny etanol-woda /1:1/. Dane fizykochemiczne otrzymanych produktów zebrąłem w tabeli 2.

Według powyższego przepisu otrzymałem:

- ftaliloglicylociliatynę /R=H/ z wydajnością 63%
- kwas N-ftaliloglicylo-1-aminoetylofosfonowy /R=H, R¹=CH₃/ z wyd. 54%,
- kwas N-ftalilo-β-alanyloaminobenzylfosfonowy /R¹=C₆H₅/ z wyd. 62%,
- kwas/N-ftaliloglicylo-2-aminoetylo/fenylofosfinowy z wyd. 55% :



W przypadku gdy użyłem ftaliloglicynę i kwas-1-amino-2-metylopropanofosfonowy otrzymałem olej /po dodaniu wody do dioksanowej mieszaniny poreakcyjnej/, który w stanie surowym poddałem hydrazynolizie otrzymując z wydajnością 20% kwas N-1-alanylo-1-amino-2-



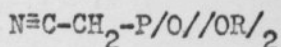
5.3. Synteza P-końcowych peptydów fosfonowych z estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych.

5.3.1. Syntezy estrów dwualkilowych kwasów aminofosfonowych.

5.3.1.1. Synteza estrów dwualkilowych ciliatyny.

5.3.1.1.1. Synteza cyjanometylofosfonianów dwualkilowych.

Cyjanometylofosfoniany



dwualkilowe otrzymywa-

łem modyfikując przepis podany w literaturze ¹⁸⁵.

W kolbie poj. 250 ml umieszczając 37,8 g /0,5M/ chloroacetonitrylu oraz 0,55 M fosforynu trójalkilowego. Kolbę łączym z aparaturą do destylacji i mieszaninę reakcyjną wolno ogrzewałem do 120°C /temperatura łaźni metalowej/. W tej temperaturze rozpoczynała się burzliwa reakcja i oddestylowała pierwsza frakcja odpowiedniego chlorku alkilowego, który zbierałem w odbieralniku chłodzonym wodą z lodem. Temperaturę łaźni doprowadzałem stopniowo do 160°C i w tej temperaturze utrzymywałem jeszcze przez trzy godziny. Po zakończeniu reakcji destylowałem produkt używając krótkiej kolumny Vigreux. Otrzymałem tak:

-cyjanometylofosfonian dwuetylowy /R=C₂H₅/

wydajność 89% ; t.wrzenia = 178-80°C/30 mm Hg /lit.t.wrz.=114-115/2 mm/
ir/film/:2260/CN/,1235/PO/

nmr/CDCl₃,HMDSz/: 1,70 ppm/t;6p;J_{H-H}=7,0 ;2xCH₃/ ; 3,34 ppm/d;2p;J_{PCH}=
=20,5 ;CH₂CN/ ; 4,56 ppm/q-q;4p;J_{H-H}=7,0 ; J_{POCH}=
=9,0;OCH₂/

analizy dla C₆H₁₂NO₃P /177/ - obl.: 7,91% N;17,51% P;

znal.: 8,02% N;17,46% P.

-cyjanometylofosfonian dwuizopropylowy /R=CH/CH₃/₂/

wydajność 83% ; t.wrz.= 116-8° C/1 mm Hg

ir/film/:2250/CN/,1230/PO/

nmr/CDCl₃,HMDSz/: 1,74 ppm/d,12p,J_{H-H}= 6,0 ;grupy CH₃/ ; 3,26 ppm/d,2p,

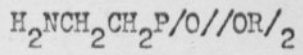
J_{PCH}=21,0;CH₂CN/ ; 4,9-5,4 ppm/m,2p,2xOCH/

analizy dla C₈H₁₆NO₃P /205/ - obl.: 6,83% N;15,12% P;

znal.: 6,80% N;15,03% P.

5.3.1.1.2.Redukcja cyjanometylofosfonianów dwuskiłowych metodą Isbella.

Reakcję tą prowadzi-



łem w sposób identyczny

jak opisano w literaturze ¹⁸⁴ otrzymując:

-2-aminoetylofosfonian dwuetylowy /R=C₂H₅/

wydajność 12-43% ; t.wrz.= 98-100° C/5 mm Hg /lit.t.wrz.= 54-6° C/0,25

mm Hg/

ir/roztwór CHCl₃/: 3370,3300/NH₂/;1230/PO/

innych analiz nie otrzymywałem ze względu na nietrwałość związku.

-2-aminoetylofosfonian dwuizopropylowy /R=CH/CH₃/₂/

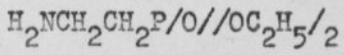
wydajność 48% ; t.wrz.= 89-90° C/0,5 mm Hg

ir/roztwór w CHCl₃/: 3375,3300/NH₂/,1235/PO/

innych analiz nie wykonywałem ze względu na nietrwałość połączenia.

5.3.1.1.3.Redukcja cyjanometylofosfonianu dwuetylowego na niklu Raneya.

Redukcję tą prowadzi-



łem modyfikując prze-

pis patentowy ¹⁸⁵.

Mieszaninę 80 g /0,45 M/ cyjanometylofosfonianu dwuetylowego,80 ml

absolutnego etanolu,25 g niklu Raneya i 15 ml ciekłego amoniaku u-

mieszczam w autoklawie poj.0,5 l.Mieszaninę reakcyjną redukowałem

wodorem pod ciśnieniem 100 atm.,w temperaturze pokojowej przez 24 go-

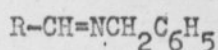
dziny.Po odsączeniu katalizatora rozdestylowałem otrzymaną mieszaninę

zbierając produkt wrzący w 97-100°C/2 mm Hg. Widmo w podczerwieni otrzymanego estru jest identyczne z otrzymanym w punkcie 5.3.1.1.2.

5.3.1.2. S y n t e z a chlorowodorków estrów dwuizopropylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych.

5.3.1.2.1. Otrzymywanie N-benzyloalkilaldimin.

Do mieszaniny



0,3 M odpowiedniego

aldehydu i 4 g bezwodnego węgla sodowego wkraplałem 32,1 g /0,3 M/ benzyloaminy z taką szybkością aby temperatura utrzymywała się w granicach 40°C, wstrząsając zawartością kolby. Po wkropleniu całości aminy zawartość kolby pozostawiałem na pół godziny w temperaturze pokojowej wstrząsając nią od czasu do czasu. Odsączałem węgiel potasu i powstałą zasadę Schiffa destylowałem pod próżnią pompki wodnej. Otrzymane produkty natychmiast używałem w następnych reakcjach. Tak otrzymałem:

-N-benzylo-izobutyloaldimine /R=CH/CH₃/2/

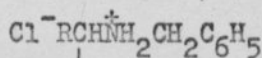
wyd. 84% ; t. wrz. = 100-2°C/17 mm Hg /lit. t. wrz. = 63°C/0,5 mm Hg ¹⁷⁶/

-N-benzylo-benzyloaldimine /R=C₆H₅/

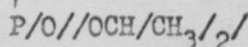
wyd. 78% ; t. wrz. = 188-91°C/17 mm Hg.

5.3.1.2.2. Otrzymywanie chlorowodorków N-benzylo-1-aminoalkilofosfonianów dwuizopropylowych.

0,1 M zasady Schiffa



zmieszałem z 13,8 g



/0,1 M/ fosforynu dwu-

izopropylowego i otrzymaną mieszaninę ogrzewałem przez godzinę w temperaturze 100°C. Wówczas podwyższałem temperaturę łaźni do 140-150°C i mieszaninę reakcyjną utrzymywałem w tej temperaturze przez 10 minut. Otrzymany gęsty olej rozpuszczałem w 200 ml bezwodnego eteru dwuetylowego, odsączałem niewielką ilość zanieczyszczeń i wytracałem

produkt przepuszczając gazowy chlorowódor przez filtrat. Otrzymany, biały, krystaliczny osad sączyłem, myłem na sączku kilkoma porcjami suchego eteru/po 20 ml każda/ i suszyłem na powietrzu. Otrzymane produkty są chemicznie czystymi. Tak zsyntezowałem:

-chlorowodorek N-benzyl-1-amino-2-metylopropanofosfonianu dwuizopropylowego /R=CH/CH₃/2/

wydajność 68% ; t. top. = 145-5°C rozkł.

ir/KBr/: 3410/NH₃⁺/, 1235/PO/

analizy dla C₁₇H₃₁ClNO₃P /363,5/ - obl.: 3,86% N; 8,52% P;

znal.: 3,62% N; 8,31% P.

-chlorowodorek N-benzylaminobenzylfosfonianu dwuizopropylowego /R=C₆H₅/

wydajność 60% ; t. top. = 141-3°C

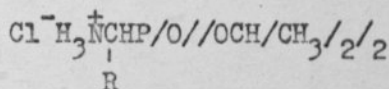
ir/KBr/: 3400/NH₃⁺/, 1260 /PO/

analizy dla C₂₀H₂₉NO₃ClP /397,5/ - obl.: 3,52% N; 7,80% P;

znal.: 3,76% N; 7,83% P.

5.3.1.2.3. Synteza chlorowodorków 1-aminoalkilofosfonianów dwuizopropylowych.

0,05 M chlorowodorku



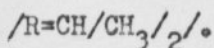
N-benzyl-1-aminoalkilo-

fosfonianu dwuizopropyl-

wego rozpuszczałem w 170 ml absolutnego metanolu lub etanolu, dodawałem 0,5 g katalizatora /tlenek palladu na węglu aktywnym/ i redukowałem wodorem pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze pokojowej. Reakcja trwała 30-45 minut, w którym to czasie zużywa się teoretycznie potrzebna ilość wodoru. Katalizator usuwałem przez odsączenie go z mieszaniny poreakcyjnej i następnie odparowywałem rozpuszczalnik z filtratu, pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymywałem gęsty olej, który kry-

stabilizował po 1-2 dniach i był chemicznie czystym chlorowodorkiem
żądanego fosfonianu. Według tej procedury otrzymałem:

-chlorowoderek 1-amino-2-metylopropanofosfonianu dwuizopropylowego



wydajność 96% ; t.top.=138-40°C

ir/KBr/: 3400,1590,1535/ NH_3^+ /,1215/PO/

nmr/ D_2O ,HMDSz/: 1,46 ppm/d,3p, $J_{H-H}=7,5$; CH_3 aminokwasu/ ; 1,49 ppm
/d,3p, $J_{H-H}=7,5$; CH_3 aminokwasu/ ; 1,76 ppm /d,2p, $J_{H-H}=7,0$; estrowe CH_3 / ;
2,25-3,0 ppm/m,2p,2xCH/ ;
3,81 ppm/d-d,p, $J_{H-H}=7,0$; $J_{PCH}=15,0$; CHP/

analizy dla $C_{10}H_{25}ClNO_3P$ /273,5/ - obl.: 5,12% N; 11,33% P;

znal.: 5,46% N; 11,07% P.

-chlorowoderek aminobenzylfosfonianu dwuizopropylowego / $R=C_6H_5$ /

wydajność 97% ; t.top.= 175-7°C

ir/KBr/: 3400,1600,1520/ NH_3^+ /,1250/PO/

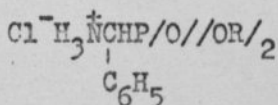
nmr/ D_2O ,HMDSz/: 1,64 ppm/d,12p, $J_{H-H}=7,0$; estrowe CH_3 / ; 4,65-5,2 ppm
/m,2p,2xOCH/ ; 5,01 ppm/d,1p, $J_{PCH}=17,0$; CHP/ ;
7,79 ppm/s,5p,fenyl/

analizy dla $C_{13}H_{23}ClNO_3P$ /307,5/ - obl.: 4,55% N ; 9,76% P;

znal.: 4,86% N; 9,95% P.

5.3.1.2.4. Otrzymywanie chlorowodorków aminobenzylfosfonianów dwualkilowych
z hydrobenzamidem.

Połączenia te otrzy-
małem metodą opisaną
w literaturze 173 .



Otrzymane produkty krystalizowałem z dioksanem. Zsyntezowałem tak:

-chlorowodorek aminobenzylfosfonianu dwuizopropylowego /R=CH/CH₃/₂/

wydajność 56%,inne dane jak dla produktu otrzymanego w punkcie

5.3.1.2.3.

-chlorowodorek aminobenzylfosfonianu dwuetylowego /R=C₂H₅/

wydajność 72% ; t.top.=159-161°C /lit.t.top.=158°C¹⁹⁵ /

ir/KBr/: 3405,16001535/NH₃⁺/,1220/PO/

nmr/D₂O_v/HMDSz/: 1,56 ppm/t,6p,J_{H-H}=7,0;2xCH₃/ ; 4,40 ppm/q-q,4p,

J_{H-H}=7,0;J_{POCH}=8,0;2xOCH₂/ ; 5,16 ppm/d,1p,J_{PCH}=

=17,0;CHP/ ; 7,80 ppm/s,5p,fenyl/

analizy dla C₁₁H₁₉ClNO₃P /279,5/ - obl.: 5,01% N;11,09% P;

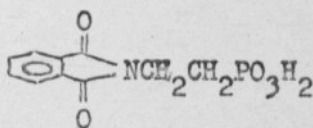
znal.: 5,13% N;10,88% P.

5.3.1.3.P r ó b y otrzymania dwualkilowych estrów ciliatyny z wolnego kwasu.

5.3.1.3.1.Synteza ftalilociliatyny.

W moździerzu

ucierałem 12,5 g



/0,1 M/ kwasu 2-amino-

etylofosfonowego oraz 14,8 g /0,1 M/ bezwodnika ftalowego.Otrzymany

proszek przenosiłem do kolby okrągłodennej,ogrzewałem przez 45 minut na łaźni metalowej utrzymując temperaturę łaźni między 180°C a 190°C.

Otrzymany produkt rozpuszczałem w 150 ml gorącej wody,sączyłem

i zostawiałem na noc w temperaturze pokojowej.Wytrącone kryształy

zbierałem na sączku i krystalizowałem z etanolu / rozpuszczałem na

zimno w etanolu i zostawiałem w lodówce/ otrzymując 17,7 - 19,2 g

produktu /wydajność 70-75%/ o temperaturze topnienia równej 196-8°C

/lit.t.top.=196-7°C/¹⁹⁹

ir/KBr/: 1695/CO/,1190/PO/

nmr/NaOD,DSS/: 1,4-2,1 ppm/m,2p,CH₂P/ ; 3,25-3,75 ppm/m,2p,CH₂N/
7,35-7,7 ppm/m,4p,ftalil/

analizy dla C₁₀H₁₀NO₅P /255/ - obl.: 5,49% N;12,16% P;

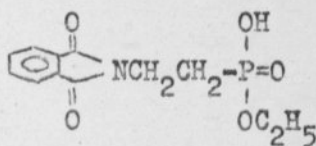
znal.: 5,40% N;12,19% P.

5.3.1.3.2.Synteza estru monoetylowego ftalilociliatyny.

Mieszaninę 120 ml

/0,8 M/ ortomrów-

czanu etylu i 10,2 g



/0,04M/ftalilociliatyny gotowałem przez trzy godziny pod chłodnicą

zwrotną.Po ostudzeniu usuwałem obecny w mieszaninie osad przez odsą-
czenie go oraz rozpuszczalnik z filtratu na wyparce obrotowej.Otrzy-
many żółty olej wytrząsałem z 60 ml heksanu.W ten sposób uzyskiwałem
szklisty osad,który zbierałem na sączku.Otrzymałem 6,5 g /62% wydaj-
ności/ produktu.

ir/nujol/: 1720/CO/,1195/PO/

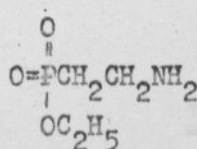
nmr/CDCl₃,HMDSz/: 1,66 ppm/t,3p,J_{H-H}=7,5;CH₃/ ; 2,58 ppm/t-t,2p,J_{H-H}=
=7,5;J_{PCH}= 18,0;CH₂P/ ; 4,05-4,7 ppm/m,4p,CH₂N,
CH₂O/ ; 7,9-8,3 ppm/m,4p,fenyl/ ; 11,59 ppm/s,p,OH/.

5.3.1.3.3.Synteza estru monoetylowego ciliatyny.

1,4 g /0,005 M/

estru monoetylo-

wego ftalilocilia-



tyny rozpuszczałem w 20 ml absolutnego etanolu i dodawałem 0,15 ml

/0,01 M/ bezwodnej hydrazyny.Otrzymany roztwór ogrzewałem do wrzenia

przez godzinę i zostawiałem na noc otrzymując osad hydrazynu kwasu

ftalowego,który usuwałem przez sączenie.Po odparowaniu rozpuszczalnika

otrzymywałem żółty olej,który rozpuszczałem ponownie w 5 ml etanolu

i znów sączyłem.Po ponownym usunięciu etanolu otrzymałem 0,63 g pro-

duktu /wydajność reakcji wynosiła zatem 82%/ jako żółtego oleju,któ-

ry pozostawiony w temperaturze pokojowej rozkłada się wydzielając amoniak.

ir/film/:3350/NH/,1230/PO/

nmr/CDCl₃,HMDSz/: 1,71 ppm/t,3p,J_{H-H}=7,5;CH₃/ ; 2,40 ppm /t-t,2p,J_{H-H}=
=7,0;J_{PCH}=19,0;CH₂P/ ; 3,2-3,6 ppm/m,2p,CH₂N/ ;
4,46 ppm/q-q,2p,J_{H-H}=7,5;J_{POCH}=8,0;CH₂O/ ; 7,80 ppm
szeroki s,3p,OH i zanieczyszczenia/.

5.3.2.Próby syntezy peptydów fosfonowych metoda DCC.

5.3.2.1.S y n t e z a karbobenzoksyaminokwasów.

Połączenia te

otrzymywałem acylując

$$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OCONHCHCOOH}$$

|
R

aminokwasy chloromrówczanem benzylu w alkalicznym roztworze wodnym metodami podanymi w literaturze 200-206. W ten sposób otrzymałem:

-karbobenzoksyglicynę /R=H/ - wyd.72%,zazwyczaj wydajność tego produktu przyjmowałem jako 100% określając w ten sposób stężenie chloromrówczanu benzylu w kupnym odczynniku.

T.top.= 118-20°C /lit.t.top.=120°C/

-karbobenzoksy-d,1-alaninę /R=CH₃/ - wyd.75% ; t.top.=113-4°C /lit.t.
top.=114-5°C/

-karbobenzoksy-l-alaninę /R=CH₃/ - wyd.78% ; t.top.=86-7°C /lit.t.top.=
=87°C/

-karbobenzoksy-d,1-walinę /R=CH/CH₃/2/ - wyd.83% ; t.top.=75-6°C /lit.
t.top.=76-8°C/

karbobenzoksy-l-walinę /R=CH/CH₃/2/ -wyd.79% ; t.top.=65-7°C /lit.t.top.=
=66-7°C/

-karbobenzoksy-l-leucynę /R=CH₂CH/CH₃/2/ - wyd.78% ; olej /lit.olej/

-karbobenzoksy-l-fenyloalaninę /R=CH₂C₆H₅/ - wyd.85% ; t.top.=90-2°C
/lit.t.top.=88-9°C/

-karbobenzoksy-d,l-fenyloalaninę /R=CH₂C₆H₅/ - wyd.84% ; t.top.=87-9°C
/lit.t.top.=89°C lub 103°C/

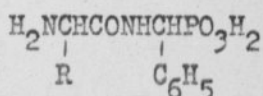
-karbobenzoksy-β-alaninę - wyd.78% ; t.top.=101-2°C

-karbobenzoksy-l-prolinę - wyd.86% ; olej /lit.t.top.=76-7°C/

5.3.2.2.S y n t e z a P-końcowych peptydów kwasu aminobenzylfosfonowego z karbobenzoksyaminokwasów.

W 20 ml chloroformu

rozpuszczałem 0,005 M



odpowiedniego karboben-

zoksyaminokwasu, dodawałem 0,8 ml suchej trójetyloaminy i następnie 0,005 M chlorowodoru aminobenzylfosfonianu dwualkilowego. Mieszaninę wytrząsano aż do uzyskania klarownego roztworu i dodawano wówczas 1,03 g /0,005 M/ dwucykloheksylokarbodwuimidu /DCC/ obserwując po chwili pojawienie się osadu. Mieszaninę reakcyjną zostawiłem w temperaturze pokojowej na noc, sączyłem i ważyłem wytrącony dwucykloheksylomocznik i do filtratu dodawałem kilka kropli lodowatego kwasu octowego w celu przeprowadzenia niez użyt ego w reakcji DCC w mocznik. Otrzymany, po ponownym przesączeniu, roztwór myłem kolejno: wodą, 1N kwasem solnym, wodą, nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodowego, 1N wodorotlenkiem sodowym, dwukrotnie wodą i w końcu nasyconym roztworem soli kuchennej. Warstwę chloroformową suszyłem bezwodnym siarczanem magnezu, odsączałem śródek suszący i usuwałem chloroform z filtratu pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany żółtawy olej rozpuszczałem w 5 ml 40% roztworu HBr w kwasie octowym i roztwór uzyskany ogrzewałem przez pół godziny w 50-60°C. Wówczas usuwałem kwas octowy na wyparce obrotowej, pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuściłem w metanolu i znów usuwałem rozpuszczalnik. Operację tę powtarzałem jeszcze dwa razy. Otrzymaną w rezultacie

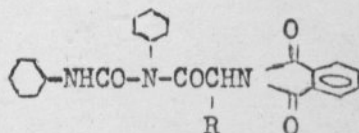
oleistą masę rozpuszczałem w 30-50 ml etanolu, wytrząsałem z niewielką ilością węgla aktywnego i do otrzymanego, po odsączeniu węgla aktywnego, bezbarwnego roztworu dodawałem tlenek propylenu /aż pH było bliskie sześć/. Krystaliczne produkty sączyłem i oczyszczałem zagotowując w absolutnym etanolu, chłodząc i ponownie sącząc produkt. Dane fizykochemiczne ta otrzymanych tak produktów podałem w tabeli 1. Próby krystalizacji otrzymanych pochodnych przez wytrącenie ich z wody acetonem prowadziły do otrzymania produktów zawierających jedną lub dwie cząsteczki wody krystalizacyjnej.

W opisany powyżej sposób otrzymałem:

- kwas N-d,l-alanyloaminobenzylfosfonowy /R=CH₃/ z wydajnością 54%,
- kwas N-l-alanyloaminobenzylfosfonowy /R=CH₃/ z wydajnością 55%,
- kwas N-l-fenylalanyloaminobenzylfosfonowy /R=CH₂C₆H₅/ z wyd. 60%,
- kwas N-l-leucyloaminobenzylfosfonowy /R=CH₂CH(CH₃)₂/ z wyd. 53%,
- kwas N-β-alanyloaminobenzylfosfonowy z wyd. 50%,
- kwas N-l-proliloaminobenzylfosfonowy z wyd. 58%.

5.2.2.3. S y n t e z a P-końcowych peptydów kwasu aminobenzylfosfonowego z ftaliloaminokwasów.

Reakcję tytułową
prowadziłem w iden-
tyczny sposób jak

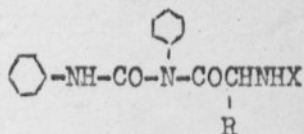


w punkcie 5.2.2.2. Po osuszeniu roztworu chloroformowego i usunięciu chloroformu pozostałość rozpuszczałem w 5 ml 40% roztworu HBr w kwasie octowym i zostawiałem w temperaturze pokojowej na trzy godziny. Następnie usuwałem nadmiar bromowodoru i kwas octowy na wyparce obrotowej, pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczałem w 20-40 ml etanolu i otrzymany roztwór wytrząsałem z niewielką ilością węgla aktywnego. Z klarownego, bezbarwnego roztworu otrzymanego po odsączeniu węgla aktywnego wytrącałem żądane produkty dodając 20-40 ml wody. Tak otrzymałem:

-N-fatloglicylo-dwucykloheksylomocznik /R=H/ z wydajnością 33%,
 -N-ftalilo-d,1-alanylo-dwucykloheksylomocznik /R=CH₃/ z wyd.28%,
 -N-ftalilo-β-alanylo-dwucykloheksylomocznik z wydajnością 35%,
 których dane fizykochemiczne podałem w tabeli 3.

5.3.2.4. P r ó b y syntezy P-końcowych peptydów ciliatyny i kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego.

0,01 M estru kwasu
 aminofosfonowego
 lub jego chlorowo-



dorku /wówczas dodawałem 0,01 M trójetyloaminy/, 0,01 M N-zablokowanego aminokwasu oraz 2,06 g /0,01 M/ DCC mieszałem w 50 ml chloroformu, dioksanu, chlorku metylenu lub acetonitrylu. Bardzo wolno pojawiały się kryształy dwucykloheksylomocznika. Mieszanie reakcyjną zostawiałem na noc w temperaturze pokojowej, usuwałem wytrącony mocznik / i ważyłem go stwierdzając, że otrzymywałem ten produkt z wydajnością 30-50%/ przez odsączenie i do filtratu dodawałem kilka kropli kwasu octowego celem wytrącenia nieprzereagowanego DCC w formie jego mocznika. Po usunięciu osadu odparowywałem rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość rozpuszczałem w 50 ml chloroformu. Roztwór chloroformowy myłem kolejno: wodą, 1N kwasem solnym, wodą, nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodowego, 1N roztworem wodorotlenku sodowego, ponownie wodą i nasyconym roztworem chlorku sodu. Po wysuszeniu warstwy chloroformowej przy pomocy bezwodnego siarczanu magnezu i usunięciu środka suszącego przez odsączenie go, usuwałem rozpuszczalnik z otrzymanego roztworu. Uzyskaną pozostałość krystalizowałem z metanolu lub roztworu metanol-woda. Właściwości fizykochemiczne otrzymanych połączeń zebrałem w tabeli 3.

W opisany powyżej sposób otrzymywałem N-acylodwucykloheksylomoczniki, dla których:

-X = ftalil, R = H, CH₂C₆H₅, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH/CH₃/₂,

-X = benzyloksykarbonyl, R = CH₃, CH₂C₆H₅*

Gdy prowadziłem tą reakcję używając ftalilo-β-alaniny i chlorowodoru estru dwuizopropylowego kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego udało mi się otrzymać, czyste chemicznie, oba produkty reakcji to jest:

-N-ftalilo-β-alanylodwucykloheksylomocznik z wydajnością 28%,

-N-ftalilo-β-alanylo-1-amino-2-metylopropanofosfonian dwuizopropylowy z wydajnością 14% ; t.top. = 156-8°C

ir/KBr/: 3320, 3260/NH/, 1720/imidowe CO/, 1655/amidowe CO/, 1570/NH/,
1230/PO/

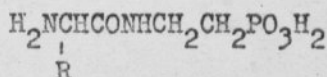
nmr/CDCl₃, HMDSz/: 0,86 ppm/d, 3p, J_{H-H} = 7,0; CH₃/ ; 0,88 ppm/d, 3p, J_{H-H} = 7,0; CH₃/ ; 1,19 ppm/d, 12p, J_{H-H} = 7,0; 4xCH₃ estrowe/ ; 2,4-2,95 ppm/m, 3p, CH₂CO, CH/ ; 3,75-3,9 ppm/m, 3p, CHN, CH₂N/ ; 4,0-4,75 ppm/m, 2p, 2xOCH/ ; 7,5-7,9 ppm/m, 4p, ftalilowe/

analizy dla C₂₁H₃₁N₂O₆P /438/ - obl.: 6,39% N; 7,08% P;
znal.: 6,76% N; 6,93% P.

5.3.3. S y n t e z a peptydów ciliatyny z karbobenzoksyaminokwasów.

Mieszanie 0,01 M

karbobenzoksyamino-



kwasu, 20 ml chloroformu i 1,7 ml trójetyloaminy schładzałem na łaźni lodowo-wodnej i dodawałem 1,0 ml /0,011 M/ chloromrówczanu etylu. Otrzymany roztwór zostawiałem w łaźni na trzydzieści minut po czym dodawałem 0,011M estru dwualki-

lowego ciliatyny. Mieszanie reakcyjną zostawiałem na noc w temperaturze pokojowej i otrzymany roztwór myłem kolejno: wodą, 1 N kwasem solnym, wodą, nasyconym roztworem kwaśnego węgla potasu, 1 N wodorotlenkiem sodowym, dwukrotnie wodą i nasyconym roztworem soli kuchennej.

Po osuszeniu roztworu bezwodnym siarczanem magnezu i odsączeniu tej soli usuwałem rozpuszczalnik na wyparce obrotowej i oleistą pozostałość rozpuszczałem w 10 ml 40% HBr w kwasie octowym. Tak otrzymany roztwór ogrzewałem przez pół godziny w temperaturze 50-60°C, kwas octowy i nadmiar bromowodoru usuwałem pod zmniejszonym ciśnieniem a uzyskaną pozostałość rozpuszczałem w 20 ml etanolu. Ponownie usuwałem rozpuszczalnik otrzymując żółty olej, który rozpuszczałem w 50 ml etanolu i z tego roztworu wydzielałem wolne peptydy wytrącając je porydyną. Jednorodne chromatograficznie produkty otrzymywałem przez krystalizację z mieszaniny etanol-woda /1:1/. Tak otrzymałem:

-glicylociliatynę /R=H/ z wydajnością 60%,

-d,l-alanylociliatynę /R=CH₃/ z wyd. 56%,

-d,l-walilociliatynę /R=CH/CH₃/₂ z wyd. 67%,

-l-fenylalanylociliatynę /R=CH₂C₆H₅/ z wyd. 58% , $I \propto I_D^{21} = +29,2^\circ /C =$
 $=9,1N NaOH/$

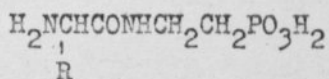
-d,l-fenylalanylociliatynę /R=CH₂C₆H₅/ z wyd 50%,

-l-prolilociliatynę z wyd. 65% , $I \propto I_D^{21} = -36,5^\circ /C = 10,1N NaOH/$.

5.3.3.2. S y n t e z a peptydów ciliatyny z ftaliloaminokwasów.

Reakcję kondensacji

ftaliloaminokwasów



z estrami ciliatyny

przewodziłem w sposób identyczny jak opisałem w punkcie 5.3.3.1.

Całkowicie zablokowane peptydy poddawałem w stanie surowym hydrazynolizie ogrzewając je przez godzinę w roztworze 0,01 M hydrazyny w 50 ml etanolu. Po usunięciu hydrazynu kwasu ftalowego i odparowaniu etanolu otrzymywałem żółty olej, który traktowałem 40% HBr w kwasie octowym jak w punkcie 5.3.3.1. W ten sposób otrzymałem:

-l-fenylalanylociliatynę /R=CH₂C₆H₅/ z wyd. 52%,

-l-leucylociliatynę /R=CH₂CH/CH₃/₂ z wyd. 59% , $I \propto I_D^{21} = +14,0^\circ /C =$
 D

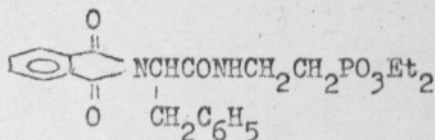
=8,1 N NaOH/.

Właściwości wszystkich peptydów ciliatyny, otrzymanych przeze mnie, zebrałem w tabeli 1.

5.3.3.3. S y n t e z a estru dwuetylowego ftalilo-1-fenylalaninociliatyny.

Reakcję sprzężenia

0,01 M ftalilo-1-fenylalaniny z 0,01 M



estru dwuetylowego ciliatyny prowadziłem identycznie jak w punkcie 5.3.3.1..Otrzymany P,N-zablokowany peptyd oczyszczałem przez kilkukrotną krystalizację z układu etanol-woda.Otrzymywałem 1,56 g /34% wydajności/ produktu o temperaturze topnienia 127-8°C.

ir/KBr/: 3300/NH/1710/CO imidu/,1665/CO amidowe/,1530/NH/,1210/PO/,

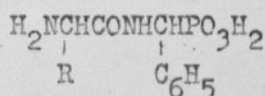
nmr/CDCl₃,TMS/: 1,65 ppm/t,6p,J_{H-H}=8,0;2xCH₃/ ; 2,21 ppm /t-t,2p, J_{H-H}=6,5;J_{PCH}=18,0;CH₂P/ ; 3,8-4,1 ppm/m,4p,CH₂N, CH₂C₆H₅/ ; 4,38 ppm/q-q,4p,J_{H-H}=8,0;J_{POCH}=9,0;2xOCH₂/ ; 5,44 ppm/d-d,1p,J_{H-H}=6,5;CH/ ; 7,50 ppm/s,5p,fenyl/ ; 8,04 ppm/szeroki s,4p,ftalil/,

analizy dla C₂₃H₂₇N₂O₆P /458/ - obl.: 6,11% N; 6,77% P;
znal.: 5,92% N; 6,80% P.

5.3.3.4. S y n t e z a peptydów kwasu aminobenzylfosfonowego.

Syntezy te prowadziłem

wychodząc z 0,005M



karbobenzoksyaminokwasu

oraz 0,005 M chlorowodoru estru dwuetylowego kwasu aminobenzylfosfonowego.Otrzymane chlorowodorki peptydów rozpuszczałem w etanolu a następnie wydzielałem wolne peptydy przy pomocy tlenku propylenu.Tak otrzymane produkty oczyszczałem przez zagotowanie z etanolem.Dane fizykochemiczne uzyskanych peptydów podałem w tabeli 1.Celem lepszego oczyszczenia otrzymanych produktów rozpuszczałem je w wodzie i wytrącałem

na gorąco acetonem. Tak otrzymane pochodne zawierają jedną lub dwie cząsteczki wody krystalizacyjnej.

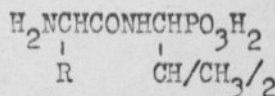
W wyżej opisanym sposobie otrzymania:

- kwas N-glicyloaminobenzylfosfonowy /R=H/ z wydajnością 75%,
- kwas N-d,l-waliloaminobenzylfosfonowy /R=CH/CH₃/₂/ z wyd. 52%,
- kwas N-l-waliloaminobenzylfosfonowy /R=CH/CH₃/₂/ z wyd. 56%,
- kwas N-l-leucyloaminobenzylfosfonowy /R=CH₂CH/CH₃/₂/ z wyd. 63%,
- kwas N-l-feniloalanyloaminobenzylfosfonowy /R=CH₂C₆H₅/ z wyd. 58%.

5.3.3.5. Synteza peptydów kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego.

Reakcję prowadziłem

identycznie jak



w punkcie 5.3.3.1.

w skali 0,007 M używając estru dwuizopropylowego chlorowodoru kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego i karbobenzoksyaminokwasów. Tak otrzymaniałem produkty, których dane fizykochemiczne podałem w tabeli 1.:

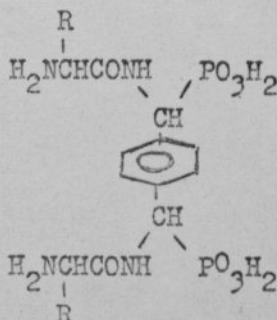
- kwas N-l-alanylo-1-amino-2-metylopropanofosfonowy /R=CH₃/ z wyd. 59%,
- kwas N-β-alanylo-1-amino-2-metylopropanofosfonowy z wyd. 56%,
- kwas N-l-leucylo-1-amino-2-metylopropanofosfonowy /R=CH₂CH/CH₃/₂/ z wyd. 49%.
- kwas N-l-feniloalanylo-1-amino-2-metylopropanofosfonowy /R=CH₂C₆H₅/ z wyd. 60%.

5.3.3.6. Synteza peptydów p-/dwaaminometylofosfona/-benzenu

Peptydy te syntezowałem w sposób identyczny z opisanym w punkcie 5.3.3.1..

Tak otrzymywałem

produkty, dla których:



- R = CH/CH₃/₂ z wydajnością 70%,

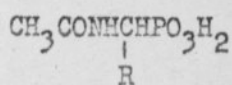
- R = CH₂CH/CH₃/₂ z wydajnością 67%.

5.4. Próba hydrolizy kwasów N-acetylo-1-aminoalkilofosfonowych pod wpływem acy-

lazu nerkowej.

5.4.1. Acylowanie kwasów aminofosfonowych bezwodnikiem octowym.

Reakcję tą prowadził



według przepisu podanego

w literaturze ^{207,208} otrzymując:

-kwas N-acetyloaminometylofosfonowy /R=H/

wydajność 58% ; t.top.=187-9°C /lit.t.top.=185°C/

ir/KBr/: 3355/NH/, 1625/CO/, 1580/NH/, 1175/PO/

analizy dla C₃H₈NO₄P /153/ - obl.: 9,15% N; 20,26% P;

znal.: 9,13% N; 20,24% P.

-kwas N-acetylo-1-aminoetylofosfonowy /R=CH₂/

wydajność 56% ; t.top.=184-6°C /lit.t.top.=186°C/

ir/KBr/: 3280/NH/, 1610/CO/, 1570/NH/, 1200/PO/

analizy dla C₄H₁₀NO₄P /167/ - obl.: 8,38% N; 18,56% P;

znal.: 7,99% N; 18,36% P.

-kwas N-acetyloaminobenzylfosfonowy /R=CH₂C₆H₅/

wydajność 65% ; t.top.=216-7°C /lit.t.top.=188°C/

ir/KBr/: 3330/NH/, 1610/CO/, 1565/NH/, 1210/PO/

analizy dla C₉H₁₂NO₄P /229/ - obl.: 6,11% N; 13,54% P;

znal.: 6,05% N; 13,50% P.

5.4.2. Próba hydrolizy kwasów N-acetylo-1-aminoalkilofosfonowych pod wpływem acylazy nerkowej.

Próby te prowadziłem opierając się na podanym toku postępowania dla aminokwasów karboksylowych²⁰⁹. Użyłem handlowego enzymu firmy "International Enzymes Limited".

Do kolby Erlenmayera poj 100 ml wprowadzałem 11,5 ml roztworu kwasu N-acetylo-1-aminoalkilofosfonowego /0,025 M/ w buforze fosforanowym /pH = 7,0/, dodawałem jeszcze 11,5 ml roztworu buforowego i do tak otrzymanego roztworu wlewałem roztwór 15 mg acylazy nerkowej w 11,5 ml buforu. Przebieg reakcji badałem przy pomocy testu ninhydrynowego²¹⁰.

Co pewien określony czas pobierałem z mieszaniny reakcyjnej 0,2 ml roztworu, zadawałem go w probówce 0,5 ml roztworu ninhydryny w metylenocellosolwie oraz 0,5 ml pirydyny stabilizowanej cyjankiem potasu. Próbkę tą rozcieńczałem do objętości 2 ml wodą destylowaną i ogrzewałem przez 20 minut na wrzącej łaźni wodnej. Wówczas rozcieńczałem ją 50% wodnym roztworem izopropanolu do objętości 10,0 ml i zawartość wolnego kwasu aminofosfonowego określałem kolorymetrycznie stosując filtr przepuszczający promienie o długości fali 550 nm. Oznaczanie stężenia wolnych aminokwasów w próbce wykonywałem w stosunku do odnośnika jakim był identyczny układ jak opisałem powyżej nie zawierający enzymu.

W próbach tych nie stwierdziłem przyrostu stężenia wolnych kwasów aminofosfonowych. W stosunku do N-acetylo-d,l-waliny /będącej tu próbką kontrolną/ enzym wykazuje pełną aktywność.

5.5. Spis tabel i tabele.

Tabela 1. P-końcowe peptydy kwasów aminofosfonowych.

Tabela 2. N-ftalilopeptydy fosfonowe.

Tabela 3. N-acylodwucykloheksylomoczniki.

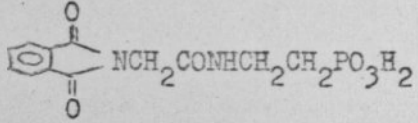
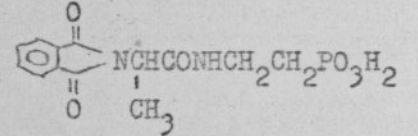
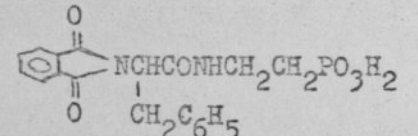
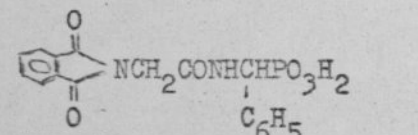
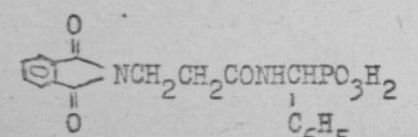
Tabela 1. P-końcowe peptydy kwasów aminofosfonowych.

L.p.	Wzór połączenia	t.top. / °C /	lit.t.top. / °C /	% N		% P		Charakterystyczne pasma absorpcji w podczerwieni /KBr/ w cm ⁻¹
				obl.	znal.	obl.	znal.	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	$H_2NCH_2CONHCH_2CH_2PO_3H_2$	270	250	15,38	15,34	17,03	16,92	3305, 1565/NH/, 1670/CO/, 1200/PO/, 1125, 1050/PO ₃ H ⁻ /
	rozkł							
2.	$H_2NCH(CH_3)CONHCH_2CH_2PO_3H_2$	310	-	14,29	14,58	15,82	16,00	3295, 1575/NH/, 1670/CO/, 1195/PO/, 1170, 1030/PO ₃ H ⁻ /
	rozkł							
3.	$H_2NCH(CH/CH_3/2)CONHCH_2CH_2PO_3H_2$	293-4	-	12,50	12,38	13,84	13,64	3280, 1570/NH/, 1660/CO/, 1210/PO/, 1125, 1025/PO ₃ H ⁻ /
	rozkł							
4.	$H_2NCH(CH_2CH/CH_3/2)CONHCH_2CH_2PO_3H_2$	275-6	-	11,81	12,09	13,00	12,80	3280, 1555/NH/, 1660/CO/, 1190/PO/, 1125, 1025/PO ₃ H ⁻ /
	rozkł							
5.	$H_2NCH(CH_2C_6H_5)CONHCH_2CH_2PO_3H_2$	288-9	-	10,29	10,58	11,40	11,36	3265, 1555/NH/, 1655/CO/, 1190/PO/, 1120, 1015/PO ₃ H ⁻ /
	rozkł							
6.	$H_2C(CH_2)CONHCH_2CH_2PO_3H_2$ NH	281-2	-	12,61	12,85	13,96	14,13	3200, 1560/NH/, 1680/CO/, 1210/PO/, 1140, 1015/PO ₃ H ⁻ /
	rozkł							
7.	$H_2NCH(CH_3)CONHCH(CH/CH_3/2)PO_3H_2$	269-70	-	12,50	12,13	13,84	13,40	3280, 1545/NH/, 1660/CO/, 1160, 1050/PO ₃ H ⁻ /
	rozkł							

1	2	3	4	5	6	7	8	9	6
8.	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHCHPO}_3\text{H}_2$ $\text{CH}/\text{CH}_3/2$	259-60 rozkł	-	12,50	12,23	13,84	13,80	3280,1550/NH/,1630/CO/,1210/PO/1160,1035/PO ₃ H	
9.	$\text{H}_2\text{NCHCONHCHPO}_3\text{H}_2$ $\text{CH}_2\text{CH}/\text{CH}_3/2$ $\text{CH}/\text{CH}_3/2$	260-1 rozkł	-	10,53	9,96	11,65	11,30	3280,1540/NH/,1665/CO/,1155,1065/PO ₃ H ⁻ /	
10.	$\text{H}_2\text{NCHCONHCHPO}_3\text{H}_2$ $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ $\text{CH}/\text{CH}_3/2$	264-5 rozkł	-	9,33	9,11	10,33	10,00	3290,1550/NH/,1665/CO/,1135,1040/PO ₃ H ⁻ /	
11.	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCHPO}_3\text{H}_2$ C_6H_5	269-70 rozkł	234-9	11,48	11,45	12,70	12,91	3260,1545/NH/,1670/CO/,1155,1050/PO ₃ H ⁻ /	
12.	$\text{H}_2\text{NCHCONHCHPO}_3\text{H}_2$ CH_3 C_6H_5	274-5 rozkł	-	10,85	10,41	12,02	11,76	3285,1545/NH/,1665/CO/,1170,1050/PO ₃ H ⁻ /	
13.	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONHCHPO}_3\text{H}_2$ C_6H_5	288-90 rozkł	-	10,85	10,60	12,02	11,80	3310,1555/NH/,1665/CO/,1160,1060/PO ₃ H ⁻ /	
14.	$\text{H}_2\text{NCHCONHCHPO}_3\text{H}_2$ $\text{CH}/\text{CH}_3/2$ C_6H_5	267-8 rozkł	-	9,79	9,62	10,84	10,46	3295,1550/NH/,1660/CO/,11501070/PO ₃ H ⁻ /	

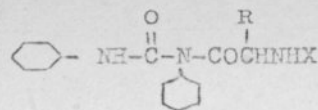
1	2	3	4	5	6	7	8	9
15.	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}/\text{CH}_3/2 \\ \\ \text{H}_2\text{NCHCONHCHPO}_3\text{H}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	266-8 rozki	-	9,33	9,01	10,33	9,96	3280,1539/NH/,1650/CO/,1170,1040/PO ₃ H ⁻ /
16.	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_2\text{NCHCONHCHPO}_3\text{H}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	287-8 rozki	-	8,38	8,25	9,28	9,01	3220,1535/NH/,1670/CO/,1180,1035/PO ₃ H ⁻ /
17.	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CHCONHCHPO}_3\text{H}_2 \\ \quad \\ \text{NH} \quad \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	285-6 rozki	-	9,86	9,71	10,92	10,56	3290,1545/NH/,1640/CO/,1150,1040/PO ₃ H ⁻ /
18.	$\begin{array}{c} / \text{CH}_3 / 2 \text{CHCH}_2\text{CHCONH} \quad \text{PO}_3\text{H}_2 \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{CH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{PO}_3\text{H}_2 \end{array}$	295-7 rozki	-	10,73	10,48	11,88	11,62	3370,1535/NH/,1665/CO/,1150,1050/PO ₃ H/
19.	$\begin{array}{c} / \text{CH}_3 / 2 \text{CHCHCONH} \quad \text{PO}_3\text{H}_2 \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{CH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{PO}_3\text{H}_2 \end{array}$	320 rozki	-	11,34	11,01	12,55	12,19	3360,1535/NH/,1660/CO/,1160,1055/PO ₃ H ⁻ /
	$\begin{array}{c} / \text{CH}_3 / 2 \text{CHCHCONH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$							

Tabela 2. N-ftalillopeptydy fosfonowe.

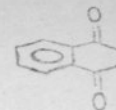
L.p.	Wzór związku	t. top. / °C /	lit. t. top. / °C /	% N		% P		Charakterystyczne pasma absorpcji w podczerwieni /KBr/ w cm^{-1}
				obl.	znal.	obl.	znal.	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.		234-6	236-8	8,97	9,01	9,93	9,71	3295,1580/NH/,1735,1675/CO/,1200/PO/
2.		202-5	-	8,59	8,25	9,51	9,22	3360,1555/NH/,1730,1630/CO/,1190/PO/
3.		118-20	-	6,96	6,89	7,71	7,92	3360,1575/NH/,1710,1640/CO/,1210/PO/
4.		283-5	253-4	7,49	7,44	8,29	7,96	3308,1550/NH/,1720,1670/CO/,1220/PO/
5.		218-20	-	7,22	7,45	8,00	8,25	3305,1535/NH/,1710,1640/CO/,1195/PO/

1	2	3	4	5	6	7	8	9
6.		219-21	-	8,21	8,03	9,09	9,23	3260,1555/NH/,1715,1655/CO/,1215/PO/
7.		218-20	225	8,97	8,77	9,93	9,50	3365,1535/NH/,1710,1655/CO/,1195/PO/
8.		204-6	-	7,53	7,93	8,33	8,20	3300,1570/NH/,1730,1655/CO/,1200/PO/

Tabela 3. N-acylodwucykloheksylomoczniki :

gdzie: Z = C₆H₅CH₂CO-

Phth=



p.p.	X	R	t.top. /°C/	lit.t.top. /°C/	% N		Charakterystyczne pasma absorpcji w ir/KBr/ w cm ⁻¹	Przesunięcia chemiczne /ppm/ i stałe sprzężeń /Hz/ w protonowym mr /CDCl ₃ , HMDSz/
					obl.	znal.		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Phth	H	185-6	-	10,22	10,08	3265, 1555/NH/, 1725, 1675/CO/	1,0-2,45/m, 20p, 10xCH ₂ /; 3,65-4,55/m, 2p, 2xCH/; 4,96/s, 2p, CH ₂ /7,4-7,75/m, 1p, NH/; 7,85-8,2/m, 4p, ftalil/
2.	Phth	CH ₃	186-7	-	9,88	9,94	3315, 3255, 1570/NH/, 1655, 1625/CO/;	1,18/d, 3p, J _{H-H} =7,0; CH ₃ /; 0,9-1,9/m, 20p, 10xCH ₂ /; 3,25-3,8/m, 2p, 2xCH/; 4,81/q, 1p, J _{H-H} =7,0; CHN/; 5,6-6,0/m, 1p, NH/; 7,5-7,9/m, 4p, ftalil/
3.	Phth	CH ₂ CH ₂ CH ₃	185-6	-	9,27	9,30	3290, 1540/NH/, 1720, 1660/CO/	1,33/t, 3p, J _{H-H} *7,5; CH ₃ /; 1,25-2,65/m, 24p, 12x CH ₂ /; 3,55-4,7/m, 2p, 2xCH/; 5,26/d-d, 1p, J _{H-H} = =6,0; NCH/; 6,6-6,9/m, 1p, NH/; 8,0-8,3/m, 4p, ftalil/
4.	Phth	CH ₂ CH/CH ₃ /2	184-5	184-5	9,00	9,32	3295, 1540/NH/, 1720, 1660/CO/	1,34/d, 6p, J _{H-H} =6,5; 2xCH ₃ /; 1,25-2,5/m, 22p, 11x CH ₂ /; 1,35-1,9/m, 1p, CH/; 3,60, 4,75/m, 2p, 2xCH/; 5,62/d-d, 1p, J _{H-H} =10,0; NH/; 6,51/d, 1p, J _{H-H} =7,0; CHN/; 7,85-8,3/m, 4p, ftalil/
5.	Phth	CH ₂ C ₆ H ₅	194-6	-	8,38	8,51	3320, 1535/NH/, 1720, 1665/CO/	1,25-2,5/m, 20p, 10xCH ₂ /; 3,89/d-d, 2p, J _{H-H} 10,0; CH ₂ C ₆ H ₅ /; 3,6-4,7/m, 2p, 2xCH/; 5,79/d-d, 1p, J _{H-H} = =10,0; CHN/; 6,59/d, 1p, J _{H-H} =7,0; NH/; 7,5-7,9/m, 4p, ftalil/

1	2	3	4	5	6	7	8	9
6.	Phth	β -Ala	169-70	-	9,88	9,68	3310,3280,1535/NH/,1715, 1665/CO/	1,0-2,15/m,20p,10xCH ₂ /;2,75/t,2p,J _{H-H} =7,0;CH ₂ C 3,25-3,9/m,2p,2xCH/;3,90/t,2p,J _{H-H} =7,0;CH ₂ N/; 6,8-7,0/m,1p,NH/;7,5-7,9/m,4p,ftalil/
7.	Z	CH ₃	216-9	-	9,80	11,62	3310,1570/NH/,1720,1625, 1610/CO/	1,3-2,25/m,20p,10xCH ₂ /;1,76/d,3p,J _{H-H} =7,0;CH ₃ / 3,7-4,15/m,2p,2xCH/;4,64/q,1p,J _{H-H} =7,0;CH/; 5,56/s,2p,CH ₂ C ₆ H ₅ /;7,81/s,5p,fenyl/
8.	Z	CH ₂ C ₆ H ₅	152-3	-	8,32	10,31	3350,3315,1539/NH/;1705, 1690,1655/CO/	0,9-2,0/m,20p,10xCH ₂ /;3,15-3,8/m,2p,2xCH/;3,91 /d,2p,J _{H-H} =7,0;CH ₂ C ₆ H ₅ /;4,98/s,2p,CH ₂ O/;5,6-6, /m,2p,NCHCO,NH/;7,34/s,5p,fenyl/

6. LITERATURA CYTOWANA.

1. F. Bohlmann, M. Grenz, Chem. Ber., 99, 3197/1966/
2. J. P. Greenstein, M. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, New York-London, 1961,
tom I, str 35.
3. M. G. Voronkov, Chemistry in Britain, 9, 411/1973/
4. B. F. Barrows, W. B. Turner, J. Chem. Soc. C, 255/1955/
5. A. G. Agroudellis, R. R. Merr, D. L. Mason, T. R. Pyke, J. F. Ziessel, Biochemistry 6, 165
/1967/
6. J. S. Kittredge, A. F. Isbell, R. R. Hughes, Biochemistry 3, 991/1964/
7. J. S. Kittredge, Praca doktorska/1965/, University of California, La Jolla, Cf.
8. E. A. Ibrahim, J. R. Ingalls, O. B. Bragg, Can. J. Anim. Sci., 50, 397/1970/
9. E. D. Korn, D. G. Deaborn, P. L. Wright, J. Biol. Chem., 249, 3335/1974/
10. E. D. Korn, D. G. Deaborn, J. Biol. Chem., 248, 2237/1973/
11. D. G. Deaborn, S. Smith, E. D. Korn, J. Biol. Chem., 251, 2976/1976/
12. D. Hendlin, E. O. Stapley, H. Jackson, H. Wallick, A. K. Miller, L. Chalet, T. H. Kahan,
E. L. Potz, W. B. Woodruff, J. M. Haita, S. Hernandez, S. Mochales, Science, 166, 122/1969/
13. B. G. Christensen, W. J. Leanza, T. P. Beattie, A. A. Batchett, B. H. Arison, R. E. Ormond,
F. A. Kuehl jr., G. Albers-Chonberg, O. Jardetzky, Science, 166, 123/1969/
14. E. Bayer, K. H. Gugel, H. Hagele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W. A. Konig, H. Zuhler, Helv.,
Chim. Acta, 55, 224/1972/
15. T. Niida, S. Inouye, T. Shomura, Y. Kondo, Y. Ogawa, H. Watanabe, S. Kanagawa, T. Watanabe,
W. Igrashi, Ger. Offen., 2.239.599/1973/, CA 78, 109315/1973/
16. Y. Ogawa, S. Inouye, T. Niida, Japan Kokai 73.85.538/1973/, CA 80, 60035/1974/
17. Y. Ogawa, S. Inouye, T. Niida, Japan Kokai 73.91.091/1973/, CA 81, 4070/1974/
18. Y. Kondo, T. Shomura, Y. Ogawa, T. Tsuruoka, H. Watanabe, K. Totsukawa, T. Suzuki,
C. Moriyama, J. Yoshida, S. Inoue, T. Niida, Sci. Reports of Meiji Seika Kaisha, 13, 34,
/1973/

19. Y.Ogawa, T.Tsuruoka, S.Inouye, T.Niida, Sci.Reports of Meji Seika Kaisha, 13, 42,
20. P.Mastalerz, Postępy Biochemii, 18, 151/1969/ /1973/
21. J.Rabinowitz, F.Woeller, J.Flores, R.Kresbach, Nature, 224, 769/1969/
22. L.D.Quin, Biochemistry, 4, 324/1965/
23. L.Benzara, S.K.Pavanarah, E.Baer, Can.J.Bioch., 48, 991/1970/
24. T.Glonek, T.O.Henderson, T.C.Myers, Science, 169, 192/1970/
25. T.O.Henderson, T.Glonek, R.L.Hildebrand, T.C.Myers, Arch.Biochem.Biophys., 149, 484 /1972/
26. R.L.Hildebrand, Praca doktorska/1972/, Diss.Abstr., 34, 2507B/1972/
27. M.Horiguchi, J.Agr.Chem.Soc.Jap., 40, R25/1966/
28. M.Marounek, S.Bartoš, T.Svoboda, Arch.Tiererhührung, 25, 513/1975/
29. T.Hori, O.Itasaka, M.Inoue, K.Yamada, J.Biochem., 62, 67/1967/
30. S.H.Bishop, J.C.Curley, ACS Meeting at Atlantic City /1974/
31. K.J.Stevenson, D.Gibson, G.H.Dixon, Can.J.Biochem., 52, 93/1974/
32. R.L.Hildebrand, T.O.Henderson, T.Glonek, T.C.Myers, Biochemistry 12, 4756/1973/
33. W.E.Roop, S.A.Tan, B.L.Roop, Anal.Biochem., 44, 77/1971/
34. R.I.Mackie, J.Dairy Sci., 56, 939/1973/
35. J.A.Alhadef, G.D.Davies jr., Biochemistry, 9, 4866/1970/
36. J.A.Alhadef, G.D.Davies jr., Biochim, Biophys Acta, 244, 211/1971/
37. H.G.Horning, D.J.Harvey, J.Chromatog., 79, 65/1973/
38. D.J.Harvey, H.G.Horning, Org.Mass.Spectrom., 9, 955/1974/
39. K.-A.Karlsson, Bioch.Biophys.Res.Comm., 39, 847/1970/
40. M.Kameyama, S.Kitaoka, Agr.BiolChem., 35, 2127/1971/
41. H.Rosenberg, J.Chromatog., 2, 487/1959/
42. K.El-Shazly, A.M.Nour, A.R.Abou-Akada, Analyst, 100, 263/1975/
43. E.Baer, G.R.Sarma, R.Robinson, Can.J.Biochem., 45, 1783/1967/
44. E.Baer, N.Stanacev, Can.J.Biochem., 44, 893/1966/
45. M.Horiguchi, M.Kandatsu, Nature, 184, 901/1959/
46. L.D.Quin, Topics in Phosphorus Chemistry, Edt.M.Grayson, E.J.Griffith, Interscience New York-London, /1967/, str.23

47. J.S. Kittredge, E. Roberts, *Science*, 164, 37/1969/
48. A.J. Slooboom, P.P.M. Bensen, *Chem. Phys. Lipids*, 5, 301/1970/
49. H. Rosenberg, *Biochim. Biophys. Acta Library*, 3, 333/1973/
50. T. Hori, *Yukagaku*, 20, 21/1971/, *CA* 74, 107139/1971/
51. T. Hori, O. Itasaka, *Yukagaku*, 24, 306, /1969/ , *CA* 71, 124536/1969/
52. T. Hori, I. Arakawa, *Kagaku To Seibutsu*, 5, 608/1967/, *CA* 68, 79783/1968/
53. M. Horiguchi, *Tampakushitsu Kakusan Koso*, 12, 315/1967/
54. M. Horiguchi, *Analytical Chemistry of Phosphorus Compounds*, Edt. M. Halmann, John Wiley, New York/1972/, str. 703
55. M. Tamari, *Tampakushitsu Kakusan Koso*, 16, 306/1971/
56. P. Fenot, *Praca doktorska, Uniwersytet Bordeaux I, Bordeaux /1975/*
57. C. Viswanathan, *J. Chromatog.*, 98, 105/1974/
58. M. Horiguchi, M. Kandatsu, *Agric. Bull. Chem. Soc. Jap.*, 24, 563/1960/
59. M. Kandatsu, M. Horiguchi, *Agr. Biol. Chem.*, 26, 721/1962/
60. M. Kandatsu, M. Horiguchi, *Agr. Biol. Chem.*, 29, 781/1965/
61. M. Horiguchi, *Tampakushitsu Kakusan Koso*, 4, 315/1966/
62. J.W. Czerkawski, C. Paulos, *J. Sci. Food Agr.*, 25, 45/1974/
63. S. Steiner, S.F. Conti, R.L. Lester, *J. Bacteriol.*, 116, 1199/1973/
64. G.R. Sarma, V. Chandrahoulis, T.A. Venkatasubramanian, *Biochim. Biophys. Acta*, 218, 561
/1970/
65. K.E. Kennedy, G.A. Thompson jr., *Science*, 168, 989/1970/
66. M. Tamari, *Agr. Biol. Chem.*, 251, 799/1971/
67. J.D. Smith, W.R. Snyder, J.H. Law, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39, 1163/1970/
68. M. Johan, J.A. Erwin, *Biochim. Biophys. Acta* 231, 80/1971/
69. V. Viswanathan, A. Nababshanam, *J. Chromatog.*, 75, 227/1973/
70. H. Berger, D.J. Hanahan, *Biochim. Biophys. Acta*, 231, 584/1971/
71. C.R. Liang, H. Rosenberg, *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 548/1966/
72. G.A. Thompson, P. Woo, *Biochemistry* 6, 2015/1967/
73. M.E. Carter, R.C. Graver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 836/1967/
74. M. Sugita, T. Hori, *J. Biochem.*, 69, 1149/1971/
75. V. Viswanathan, H. Rosenberg, *J. Lipid Res.*, 14, 327/1973/

76. H. Berger, P. Jones, D. J. Hanahan, *Biochim. Biophys. Acta*, 260, 617/1972/
77. J. S. Kittredge, M. Horiguchi, P. H. Williams, *Comp. Biochem. Physiol.*, 29, 859/1969/
78. A. E. Ibrahim, J. R. Ingalls, *J. Dairy Sci.*, 55, 971/1972/
79. A. R. Abou-Akada, D. A. Messmer, L. R. Fina, E. E. Bartley, *J. Dairy Sci.*, 51, 78/1968/
80. R. M. C. Dawson, P. Kemp, *Biochem. J.*, 105, 837/1967/
81. J. S. Kittredge, R. R. Hughes, *Biochemistry*, 3, 991/1964/
82. H. Rosenberg, *Nature*, 203, 2999/1967/
83. J. S. Kittredge, E. Roberts, D. C. Simonsen, *Biochemistry*, 1, 624/1962/
84. E. Roberts, J. S. Kittredge, *U.S. Clearinghouse Fed. Sci. Inf.*/1969/697976
85. A. F. Shelbourne, L. D. Quin, *Biochim. Biophys. Acta*, 148, 595/1967/
86. L. D. Quin, A. F. Shelbourne, *J. Marine Res.*, 27, 73/1969/
87. A. F. Shelbourne, *Praca doktorska/1968/*, Duke University, Durham, North Carolina.
88. J. S. Kittredge, A. F. Isbell, R. R. Hughes, *Biochemistry*, 6, 289/1967/
89. K. -A. Karlsson, *Chem. Phys. Lipids*, 5, 6/1970/
90. K. -A. Karlsson, *Lipids*, 5, 878/1970/
91. K. -A. Karlsson, B. E. Samuelsson, *Biochim. Biophys. Acta*, 337, 204/1974/
92. W. T. Matson, *Biochim. Biophys. Acta*, 280, 538/1972/
93. G. Rouser, G. Kritchevsky, D. Heller, E. Lieber, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40, 429/1963/
94. G. Simon, G. Rouser, *Lipids*, 2, 55/1967/
95. J. S. Kirkpatrick, S. H. Bishop, *Biochemistry*, 12, 2829/1973/
96. L. D. Quin, *Science*, 144, 1133/1964/
97. H. Shimizu, J. Kakimoto, T. Nakajima, A. Kanazawa, I. Sano, *Nature*, 207, 1197/1965/
98. A. J. de Konig, *J. Sci. Fd. Agric.*, 17, 460/1966/
99. A. J. de Konig, *Nature*, 210, 113/1966/
100. T. Matsubara, *Chem. Phys. Lipids*, 14, 247/1975/
101. T. Hori, O. Itasaka, H. Inoue, K. Yamada, *J. Biochem.*, 56, 477/1964/
102. T. Hori, O. Itasaka, H. Inoue, *J. Biochem.*, 59, 570/1966/
103. T. Hori, I. Arakawa, *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 898/1969/
104. T. Hori, O. Itasaka, M. Sugita, I. Arakawa, *Shiga Daigaku Kyoiku Gakubu Kiyo Shizenkagaku*, 17, 23/1967/, *CA* 70, 25746/1969/
105. T. Hori, I. Arakawa, M. Sugita, O. Itasaka, *J. Biochem.*, 64, 533/1968/

106. T. Hori, I. Arakawa, Shiga Daigaku Kyoiku Gakubu Kiyo Shizenkagaku, 16, 25/1966/
107. T. Hori, M. Sugita, O. Itasaka, J. Biochem., 65, 451/1969/
108. T. Hori, I. Arakawa, M. Sugita, 75th International Congress of Biochemistry, Tokyo, 1967,
109. M. Sugita, T. Hori, Y. Swada, Seikagaku, 40, 158/1968/, CA 70, 35428/1968/
110. S. Higashi, T. Hori, Biochim. Biophys. Acta., 152, 568/1968/
111. T. Hori, M. Sugita, C. Nishimori, O. Itasaka, Yukagaku, 24, 1161/1975/
112. T. Hori, M. Sugita, C. Nishimori, O. Itasaka, Yukagaku, 24, 118/1975/
113. M. Tamari, M. Kametaka, Agr. Biol. Chem., 36, 1147/1972/
114. T. Matsubara, A. Hayashi, Biochim. Biophys. Acta., 296, 171/1973/
115. T. Matsubara, Biochim. Biophys. Acta., 388, 353/1975/
116. C. R. Liang, K. P. Strickland, Can. J. Biochem., 47, 85/1969/
117. C. R. Liang, H. Rosenberg, Comp. Biochem. Physiol., 25, 673/1968/
118. C. R. Liang, H. Seruga, K. P. Strickland, Can. J. Biochem., 48, 580/1970/
119. G. Simon, G. Rouser, Lipids 4, 607/1969/
120. T. Hori, O. Itasaka, H. Akai, Jap. Expl. Med., 25, 81/1965/
121. A. Hayashi, F. Matsuura, T. Matsubara, Biochim. Biophys. Acta., 176, 208/1969/
122. A. Hayashi, F. Matsuura, Biochim. Biophys. Acta., 248, 133/1971/
123. A. Hayashi, T. Matsubara, F. Matsuura, Yukagaku, 18, 118/1968/, CA 70, 103092/1969/
124. F. Matsuura, T. Matsubara, A. Hayashi, J. Biochem., 74, 49/1973/
125. A. Hayashi, F. Matsuura, Chem. Phys. Lipids, 10, 51/1972/
126. A. Hayashi, F. Matsuura, T. Matsubara, Yukagaku, 25, 501/1976/
127. A. J. de Konig, J. Chromatog., 59, 185/1971/
128. S. Yashuda, Yukagaku, 18, 239/1969/, CA 71, 45988/1969/
129. Y. Kohai, S. Matsukawa, H. Satake, Biochim. Biophys. Acta., 316, 271/1973/
130. A. J. de Konig, Biochim. Biophys. Acta., 202, 187/1970/
131. M. Tamari, M. Kametaka, Agr. Biol. Chem., 37, 933/1973/
132. J. A. Alhadef, J. T. van Bruggen, G. D. Davies jr., Biochim. Biophys. Acta., 286, 103/1972/
133. S. Hasegawa, M. Tamari, M. Kametaka, Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 47, 673/1973/,
CA 80, 131019/1974/
134. R. Maget-Dana, M. Tamari, J. M. Marmouyet, L. Douste-Blazy, Eur. J. Biochem., 42, 129/1974/
135. M. Tamari, Tampakushitsu Kakusan Koso, 21, 33/1976/

136. M. Tamari, M. Horiguchi, M. Kandatsu, Nippon Nogeï Kagaku Kaishi, 49, 933/1974/
137. S. Hasegawa, M. Tamari, M. Kametaka, Nippon nogeï Kagaku Kaishi, 49, 539/1974/
138. S. Hasegawa, M. Tamari, M. Kametaka, O. Itasaka, Nippon Nogeï Kagaku Kaishi, 50, 431/1976/
139. R. Marmouyet, R. Maget-Dana, L. Douste-Blazy, Biochimie, 57, 261/1975/
140. W. Baldwin, J. Braven, J. Mar. Biol. Ass. U.K., 48, 603/1968/
141. F. Geike, J. Chromatog., 144, 181/1969/
142. S. H. Bishop, A. U. Alam, 156th National Meeting of ACS, Atlantic City /1968/, abstr. 267
143. M. Hariharan, R. J. Motekajtis, A. E. Martell, J. Org. Chem., 40, 470/1975/
144. K. Issleib, R. Kummel, Chem. Ber., 100, 1335/1967/
145. J. C. Pralon, H. Jensen, E. Neuzil, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 109, 85/1970/
146. J. Prignet, Praca doktorska, Uniwersytet Bordeaux I, Bordeaux/1976/
147. H. Jensen, F. Habault, A. M. Lacoste, A. Cassaigne, E. Neuzil, J. Chromatog., w druku,
148. M. Hariharan, S. Chaberek, A. E. Martell, Synth. Commun., 3, 375/1973/
149. W. F. Gilmore, M. A. McBride, J. Pharm. Sci., 63, 1087/1974/
150. S. I. Hong, M. K. Rho, Y. J. Kim, Taehan Hwahak Hoechi, 19, 134/1975/, CA 83, 59256/1976/
151. F. R. Atherton, H. J. Hall, C. H. Hassall, R. W. Lambert, P. S. Ringrose, Ger. Offen., 2.602.193
/1976/
152. W. K. Buriczenko, K. T. Poroszin, S. B. Dawidiant, L. S. Kuzjat, Dokł. akad. Nauk Tadż. SSR,
2, 17/1966/, CA 56, 18852/1967/
153. K. T. Poroszin, W. K. Buriczenko, Dokł. Akad. Nauk Tadż. SSR, 6, 16/1963/, CA 61. 13410/1964/
154. K. T. Poroszin, W. K. Buriczenko, Dokł. Akad. Nauk SSSR, 156, 386/1964/
155. J. W. Huber III, W. F. Gilmore, L. W. Robertson, J. Med. Chem., 18, 1317/1975/
156. J. W. Huber III, Praca doktorska/1974/, Diss. Abstr., 35, 1214B/1974/
157. K. Yamauchi, M. Kinoshita, H. Imoto, Bull. Chem. Soc. Jap., 45, 1518/1972/
158. H. K. Rho, S. I. Hong, Y. J. Kim, Taehan Hwahak Hoechi, 19, 169/1975/, CA 83, 114900/1975/
159. J. P. Bielow, W. D. Dawankow, W. A. Cyriapkin, S. W. Rogożin, Izw. Akad. Nauk SSSR ser. chim.,
1505/1975/
160. M. Cortrait, M. Avignon, J. Prignet, C. Carrigou-Lagrange, J. Mol. Struct., 32, 45/1976/
161. A. M. Lacoste, A. Cassaigne, M. Tamari, E. Neuzil, Biochimie, 58, 703/1976/
162. A. Cassaigne, A. M. Lacoste, E. Neuzil, Compt. Rend. Acad. Sci. D, 282, 1637/1976/
163. K. Yamauchi, M. Kinoshita, H. Imoto, Bull. Soc. Chem. Jap., 45, 2531/1972/

164. K. Yamauchi, Y. Mitsuda, M. Kinoshita, Bull. Chem. Soc. Jap., 48, 3285/1975/
165. N. Ezaki, S. Amano, F. Fukushiha, S. Inouye, T. Nida, Sci. Reports of Meiji Seika Kaisha,
13, 54/1973/
166. E. Sim, Ch. A. Pasternak, Biochem. J., 154, 105/1976/
167. R. G. Edwards, A. R. Hands, Biochim. Biophys. Acta., 341, 303/1976/
168. M. Bodanszky, Bull. Chim. Thérapetique, 2, 145/1972/
169. J. P. Greenstein, M. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, New York-London, 1961, tom I,
str 627
170. G. N. Kosolapoff, L. Maier, Organic Phosphorus Compounds, Wiley Interscience, New York-
London-Sydney-Toronto, 1972, tom V
171. Cz. Wasilewski, K. Sobczak, doniesienie prywatne
172. W. F. Gilmore, M. A. McBride, J. Am. Chem. Soc., 94, 4361/1973/
173. S. W. Rogozin, W. A. Dawankow, J. P. Biełow, Izv. Akad. Nauk SSSR ser. chim., 955/1973/
174. P. Mastalerz, J. Kowalik, doniesienie prywatne
175. Cz. Wasilewski, M. Hoffmann, doniesienie prywatne
176. R. Tyka, Tetrahedron Lett., 677/1970/
177. J. P. Greenstein, M. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, New York -London, 1961, tom II
str. 901
178. K. D. Berlin, R. T. Claunch, E. T. Gaudy, D. Bude, J. Org. Chem., 33, 3090/1968/
179. K. D. Berlin, N. K. Roy, R. T. Claunch, D. Bude, J. Am. Chem. Soc., 90, 4494/1968/
180. S. Asano, T. Kitahara, T. Ogawa, M. Matsui, Agr. Biol. Chem., 37, 1193/1973/
181. T. J. Medwed, M. I. Kabaczniak, Dokł. Akad. Nauk SSSR, 84, 117/1952/
182. T. J. Medwed, M. I. Kabaczniak, Izv. Akad. Nauk SSSR, ser. chim., 314/1954/
183. T. J. Medwed, M. I. Kabaczniak, Izv. Akad. Nauk SSSR, ser. chim., 1357/1957/
184. A. F. Isbell, J. P. Berry, L. W. Tensey, J. Org. Chem., 37, 4399/1972/
185. R. Braden, U. Hendricks, G. Oortel, R. Schliebs, Ger. Offen., 2.032.712/1972/
186. M. Kinoshi, I. Taugihoro, H. Shigegezu, Jap. Kokai 72.46.574/1972/
187. R. Tyka, J. Łukszo, doniesienie prywatne
188. M. Hoffmann, Cz. Wasilewski, Roczniki Chemii, 50, 139/1976/
189. A. N. Pudowik, C. M. Denisowa, Dokł. Akad. Nauk SSSR, 80, 65/1951/

190. A. N. Pudowik, G. M. Denisowa, *Żurn. Obszcz. Chimi*, 23, 263/1953/
191. J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chemistry of the Amino Acids*, New York-London, John Wiley, 1961, str. 1017
192. J. Barycki, P. Mastalerz, M. Soroka, *Tetrahedron Lett.*, 3147/1970/
193. J. Barycki, P. Mastalerz, H. Ratajczak, M. Soroka, *Roczniki Chimi*, 45, 557/1971/
194. R. Tyka, *Praca habilitacyjna /1972/, Politechnika Wrocławska*
195. M. E. Chalmers, G. N. Kosolapoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 5278/1953/
196. J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chemistry of the Amino Acids*, New York-London, John Wiley, 1961, tom II str. 901
197. J. P. Greenstein, M. Winitz., tamże, tom II, str. 968
198. J. P. Greenstein, M. Winitz, tamże, tom II str. 1042
199. E. Baer, N. Stanacev, *J. Biol. Chem.*, 239, 3209/1964/
200. J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chemistry of the Amino Acids*, New York-London, John Wiley, 1961 tom II str. 887-895
201. J. P. Greenstein, M. Winitz, tamże, tom II, str. 929-31
202. H. Bergman, L. Zervas, *Chem. Ber.*, 85, 1192/1950/
203. R. Kuhn, N. Ruglis, *Chem. Ber.*, 85, 38/1950/
204. S. W. Fox, H. Fling, H. Wax, C. W. Pettiga, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1862/1950/
205. R. A. Boissonas, S. Guttman, R. L. Huguenn, P. -A. Jaguenold, E. Sandrin, *Helv. Chim. Acta*, 41, 1867/1958/
206. A. Berger, J. Kurtis, E. Katchalski, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 5552/1954/
207. M. I. Kabacznik, T. J. Medwed, *Izv. Akad. Nauk SSSR, ser. chim.*, 1126/1953/
208. T. J. Medwed, M. I. Kabacznik, *Izv. Akad. Nauk SSSR, ser. chi.*, 1043/1955/
209. J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chemistry of the Amino Acids*, New York-London, John Wiley, 1961, tom II, str. 1756
210. P. Mastalerz, G. Richtarski, *Roczniki Chimi*, 45, 763/1971/
211. B. Park, A. Mirola, H. Sakai, *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1905/1976/
212. S. Hasegawa, M. Tamari, M. Kametaka, *J. Biochem.*, 80, 531/1976/

Niniejszy Komunikat otrzymują:

1. Biblioteka Główna Politechniki Wrocławskiej 1 egz.
2. Biblioteka Inst.Chemii Organicznej i Fiz. 1 egz.
3. Autor 5 egz.

		1 2 3 4 5 6 7 0	9
	* N *	N N P T T A N	Ø 4 Ø 8
	Rozpocz. pr.	Zakończ. pr.	Opubl. pr.
			Instytut
			Nr tematu
	1 Ø 7 2	Ø 3 7 7	I Ø 4 Ø 3 3 2 4 Ø 3
	Nr zlecenia	Nr archiwalny	
	5.7./7.6.	I.Ø.4./K-1.90/7.7 *	
	Symbol UKD		
	547.241	Pochodne fosforu	
		77: Inst.Chem. Org.PWr., MNSzWT	
		pol.	
Opis bibliograficzny			
Kafarski Paweł			
Synteza peptydów kwasów aminofosfonowych.			
Komunikaty Inst.Chem.Org.PWr., 1977,			
nr 190			
107 s. 7 rys. 11 tabl., bibliogr. 212 poz.			
/maszyn. powiel./.			
Charakter pracy:	podstawowa	Rozpowszechnienie	-
Materiały odpłatne	A		

Analiza dokumentacyjna

<D

Przeprowadzono próby zaadoptowania klasycznych metod syntezy peptydów do otrzymania P-końcowych peptydów kwasów aminofosfonowych. Jako substratów używano zarówno wolnych kwasów aminofosfonowych jak i ich estrów dwualkilowych. Stwierdzono, że niezablokowane kwasy aminofosfonowe nie są dobrymi substratami do otrzymywania żądanych połączeń. Także metoda DCC /gdy stosowano estry/ nie przyniosła spodziewanych efektów. Ogólną i dobrą metodą syntezy peptydów fosfonowych jest metoda mieszanych bezwodników karboksylowo-karbonowych gdy substratami reakcji są estry kwasów aminofosfonowych. Metodą tą otrzymano szereg peptydów ciliatyny, kwasu aminobenzylfosfonowego i 1-amino-2-metylopropanofosfonowego.

Imię i Nazwisko autora analizy

Paweł Kafarski

Słowa kluczowe

<S

peptydy fosfonowe, fosfonopeptydy, peptydy kwasów aminofosfonowych.

**0480*00*

<A _____ *B _____ *C _____ *D _____

*E _____ *F _____ *G _____ *H _____



Tylko PRL	CINTE	APW	Podpis red.	Podpis asyst. d/s badań.	Potwierdzenie przyjęcia poprawki.	Potwierdzenie przyjęcia karty w Oddziale Dokumentacji.
NIE	TAK	TAK				
Wpisać TAK lub NIE						