

Artur Mucha

**Fosfonamidowe
oraz fosfinopeptydowe
inhibitory metaloprotez**

Artur MUCHA*

Fosfonamidowe oraz fosfinopeptydowe inhibitory metaloproteaz

Przedstawiono wyniki prac dotyczące syntezy i aktywności biologicznej pseudopeptydów zawierających ugrupowanie fosfonamidowe oraz fosfinowe, uważanych za analogi tetraedrycznego stanu przejściowego enzymatycznej hydrolizy wiązania amidowego. Opisano procedury zastosowane do syntezy ich bezpośrednich prekursorów, tj. monoestrów kwasów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkano-fosfonowych oraz *H*-fosfinowych. Szczególną uwagę poświęcono otrzymywaniu enancjomerycznie czystych substratów oraz kontroli ich czystości optycznej z użyciem odpowiednich dyskryminatorów chiralności, takich jak: cyklodekstryny lub alkaloidy chinolinowe oraz prostych metod spektroskopowych i chromatograficznych. Przystudiowano przebieg tworzenia wiązania fosfonamidowego w różnych typach reakcji wiodących przez odpowiednie fosfono-chlorki. Skorelowano labilność hydrolityczną otrzymanych fosfonamidów z ich strukturą, a przede wszystkim z obecnością grup ochronnych w cząsteczce oraz z pH roztworu. Udowodniono wyjątkową nietrwałość wiązania P–N (pH < 12) w całkowicie odblokowanych analogach dipeptydów wykluczającą ich praktyczne zastosowania. Wykazano interesującą reaktywność *O*-fenyłowych fosfonamidów, które ulegały transestryfikacji w zasadowych warunkach. W badaniach dotyczących syntezy fosfinopeptydów skoncentrowano się na rozwijaniu metod otrzymywania ich elektrofilowych prekursorów – α -podstawionych akrylanów. Opracowano także metodę umożliwiającą na wprowadzenie i wielokierunkową funkcjonalizację podstawnika P1' odpowiednich dipeptydów oraz przetestowano nowe metody wydłużania łańcucha pseudopeptydowego. Otrzymane związki posłużyły do badań nad regulacją aktywności takich metaloproteaz, jak: matryksyny oraz leucyloaminopeptydazy, a także protez cysteinowych, np. katepsyna C. Do opracowania efektywnych inhibitorów oraz optymalizacji ich struktury użyto metod chemii kombinatorycznej oraz racjonalnego projektowania ligandów wiążących się do odpowiednich receptorów.

* Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław.

Wykaz używanych skrótów

AaaP	– fosfonowy analog aminokwasu, np.: GlyP, LeuP, PheP, itd. (aminokwasy oznaczano standardowymi trzyliterowymi skrótami)
H–Aaa ₁ P[X]Aaa ₂ –OH	– fosfonamidowy (X = NH), fosfonowy (X = O) lub fosfinowy (X = CH ₂) analog dipeptydu
Ac	– grupa acetylowa
ACE	– enzym konwertujący angiotensynę I
Ad	– grupa 1-adamantylowa
Aep	– kwas 2-aminoetanofosfonowy
APM	– aminopeptydaza N
Boc	– grupa <i>tert</i> -butyloksykarbonylowa
BOP	– heksafluorofosforan (benzotriazolo-1-yloksy)tris(dimetyloamino)fosfoniowy
BroP	– heksafluorofosforan bromotris(dimetyloamino)fosfoniowy
BTSA	– <i>N,O</i> -bis(trimetylosilylo)acetamid
<i>i</i> -Bu	– grupa izobutylowa
<i>t</i> -Bu	– grupa <i>tert</i> -butylowa
Bzh	– grupa benzhydrylowa (difenylometylowa)
Bzl	– grupa benzylowa
Cbz	– grupa benzyloksykarbonylowa
CD	– cyklodekstryny: α , β oraz γ
CE	– elektroforeza kapilarna
Col	– kolagenaza
CPA	– karboksypeptydaza A
CQD	– <i>O</i> -9-(<i>t</i> -butylokarbamoilo)chinidyna
DABCO	– 1,4-diazabicyklo[2,2,2]oktan
Dap	– kwas 2,3-diaminopropionowy
DCC	– <i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DIEA	– diizopropylodetyloamina
DMF	– <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSO	– dimetylosulfotlenek
Dnp	– grupa 2,4-dinitrofenylowa
Dns	– reszta kwasu 5-(dimetyloamino)-1-naftalenosulfonowego
DPP I	– peptydaza dipeptydylowa I, katepsyna C
DPPA	– azydek difenylofosforanowy
ECE	– enzym konwertujący endotelinę
EDC	– <i>N</i> -(3-dimetyloaminopropyl)- <i>N'</i> -etylokarbodiimid

Et	– grupa etylowa
Fmoc	– grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
Gel	– żelatyna
HBTU	– heksafluorofosforan <i>O</i> -benzotriazol-1-ylo- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylouroniowy
HMDS	– 1,1,1,3,3,3-heksametylodisilazan
HOBt	– 1-hydroksybenzotriazol
^{HO} LeuP	– kwas 1-hydroksy-3-metylobutanofosfonowy
HP- γ -CD	– 3-hydroksypropylo- γ -cyklodekstryna
hPhe	– homofenyloalanina
HPLC	– wysokorozdzielcza chromatografia cieczowa
IC_{50}	– stężenie inhibitora, przy którym hamowane jest 50% aktywności enzymu
K_i	– stała inhibicji enzymu
LAP	– leucyloaminopeptydaza
LytM	– autolizyna bakteryjna
Mat	– matrylizyna
Me	– grupa metylowa
Mca	– reszta kwasu 7-metoksykumaryno-4-octowego
MMP	– metaloproteinaza matriksowa, matryksyna
MT-MMP	– transmembranowa metaloproteinaza matriksowa
NBS	– <i>N</i> -bromobursztynimid
NCS	– <i>N</i> -chlorobursztynimid
NEP	– neprylizyna, endopeptydaza 24.11
NMM	– <i>N</i> -metylomorfolina
NMP	– <i>N</i> -metylopirolidon
ORD	– dyspersja skręcalności optycznej
Ph	– grupa fenyłowa
Phg	– fenyloglicyna
Pht	– grupa ftalilowa
pPhe	– kwas 2-amino-5-fenylopentanowy
SPPS	– synteza peptydów na stałym nośniku
Str	– stromelizyna
Su	– grupa bursztynimidowa
TLN	– termolizyna
TIMP	– tkankowy inhibitor metaloproteinaz matriksowych
TMSBr	– bromotrimetylosilan
TMSCl	– chlorotrimetylosilan

1. Wprowadzenie

W połowie ubiegłego stulecia wraz z postępem nauk biochemicznych zaczęto zdawać sobie sprawę, że enzymy proteolityczne (proteazy, peptydazy) pełnią w organizmie wiele innych, znacznie bardziej złożonych funkcji poza trawiennymi. Nie dysponowano jednak wtedy metodami poznawczymi do badania ich struktury i funkcji w komórce. Obecnie, odkrywanie nowych białek odbywa się za pomocą genomiki, a do interpretowania ich bezpośredniej komórkowej aktywności, także w stanach patologicznych, służy proteomika funkcjonalna. Materiał biologiczny jest łatwiej dostępny, szybciej i efektywniej oczyszczany, a następnie chemicznie i biochemicznie charakteryzowany z użyciem zaawansowanych technik. Dla enzymów proteolitycznych ten półwieczny postęp zaowocował całościowym scharakteryzowaniem (wraz ze strukturą trzeciorzędową) blisko połowy tych białek, spośród około pięciuset pięćdziesięciu o zidentyfikowanych sekwencjach kodujących [1, 2]. Wraz z sekwencjami naturalnych oligopeptydowych inhibitorów proteaz stanowi to ponad 2% ludzkich genów, co dobitnie pokazuje znaczenie tych związków w organizmie. Mimo poznania całości genomu człowieka oraz rozwoju metod obliczeniowych, umożliwiających rozszerzanie dostępnej wiedzy eksperymentalnej na funkcję nieznanymi białek na podstawie ich sekwencji, znalezienie zależności między genami a stanem i funkcją produktów ich translacji w komórce jest wciąż odległe. Procesy życiowe z udziałem białek podlegają bowiem ściśle, wielopoziomowej, posttranslacyjnej regulacji i kontroli. Dzieje się tak również w przypadku enzymów proteolitycznych, dla których dwa podstawowe, naturalne mechanizmy kontrolne: aktywacja proenzymów (zymogenów) oraz działanie naturalnych inhibitorów są często połączone kaskadowo. Kaskady proteolityczne stanowią kluczowe etapy podstawowych procesów życiowych, takich jak: trawienie, wzrost i różnicowanie komórek, obrona immunologiczna organizmu, programowana śmierć komórki i inne. Wewnętrzne czy zewnętrzne zaburzenia w funkcjonowaniu tych zależności mają poważne skutki patologiczne. Dlatego wartość studiów nad działaniem proteaz, zarówno ludzkich, jak i patogennych, jest nie do przecenienia w zrozumieniu etiologii chorób, a następnie określeniu optymalnych molekularnych celów do opracowania nowych leków. Projektowanie oraz synteza aktywnych, a jednocześnie selektywnych inhibitorów regulujących funkcjonowanie odpowiednich enzymów, to podstawowe wyzwanie dla tego procesu. Główny cel to zarówno pojedyncze peptydazy, np.: proteaza wirusa HIV-1 czy enzym konwertujący angiotensynę, jak i elementy wchodzące w skład złożonych szlaków proteolitycznych, np.: kaspazy regulujące apoptozę, enzymy zaangażowane w proces krzepnięcia krwi czy metaloproteazy matriksowe kontrolujące angiogenezę i remodelowanie tkanek [3–11]. Uzyskanie odpowiednio silnych ich inhibitorów stwarza perspektywę zastosowania takich związków

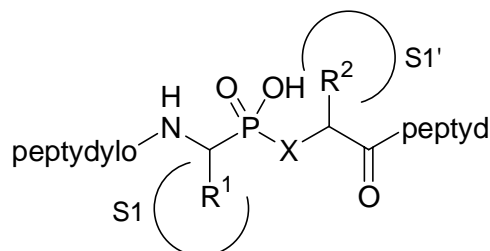
w terapii wielu chorób, jak przykładowo: nowotworowe [12–15], układu odpornościowego [16–19], neurodegeneracyjne [20–23] i inne, a także w leczeniu infekcji bakteryjnych, grzybiczych i wirusowych [24–27] (reprezentatywne przeglądy literaturowe po roku 2000).

Enzymy proteolityczne sklasyfikowano nie na podstawie ich struktury, ale na podstawie chemicznego mechanizmu katalizy hydrolizy wiązania amidowego w substratach peptydowych [28, 29]. Proteazy serynowe (oraz treoninowe) i cysteinowe używają katalitycznej reszty bocznej łańcucha białkowego (odpowiednio: Ser195 w chymotrypsynie i Cys25 w papainie jako archetypicznych przedstawicielach) jako nukleofila w reakcji. Grupa nukleofilowa jest aktywowana obecnością sąsiadującego, zasadowego pierścienia imidazolowego histydyny. W wyniku substytucji tworzy się hemiacetalowy (lub tiohemiacetalowy) tetraedryczny stan przejściowy stabilizowany we wnęce oksyanionu. Jego rozpad powoduje powstanie acyloenzymu oraz uwolnienie aminowej grupy odchodzącej. Hydroliza acyloenzymu następuje przez kolejny stan tetraedryczny i podobnie jak pierwszy etap jest katalizowana kwasowo-zasadowo z udziałem odpowiednich reszt bocznych białka. Proteazy asparaginowe (oraz glutaminowe) i metalozależne (metaloproteazy) używają natomiast aktywowanej cząsteczki wody jako nukleofila w jednoetapowej reakcji. Role reszt aktywujących spełniają grupy karboksylowe kwasowych aminokwasów białka (Asp lub Glu) albo kation metalu, najczęściej cynku.

Niezależnie od dokładnego mechanizmu reakcji, najsilniejsze interakcje z substratem powinny występować w stanach przejściowych procesu, zmniejszając w ten sposób energię jego aktywacji. Koncepcja ewolucyjnej orientacji reszt centrum aktywnego proteaz, w celu najefektywniejszego wiązania stanów przejściowych, została zaproponowana jako idea konstruowania inhibitorów o strukturach opartych na odpowiednim podobieństwie do tych stanów [30, 31]. Analogi peptydów, w których hydrolizowane wiązanie amidowe „zastąpiono” tetraedryczną resztą zawierającą atom fosforu: fosfonamidową (**1**, P–NH), fosfonową (**2**, P–O) lub fosfinową (**3**, P–CH₂) (rys. 1) okazały się bardzo interesujące. W rezultacie dało to impuls do niezwykle intensywnego, trwającego do tej pory, rozwoju metod ich syntezy. Badania te oraz przykłady zastosowania otrzymanych związków stały się przedmiotem kilkuset publikacji naukowych, opisujących między innymi opracowanie syntetycznych inhibitorów enzymów, które należą do najsilniejszych spośród dotychczas poznanych.

Z czasem koncepcja podobieństwa ugrupowania –P(O)(OH)–X– do stanu przejściowego hydrolizy wiązania peptydowego musiała ulec pewnej ewolucji, nie w każdym bowiem przypadku przyniosła ona oczekiwane wyniki. Fosforowe analogi peptydów okazały się szczególnie aktywnymi inhibitorami metaloproteaz, dla których zaproponowane podobieństwo jest dodatkowo związane z kompleksowaniem przez resztę fosforową kluczowego dla katalizy kationu metalu obecnego w centrum aktywnym.

Również w przypadku proteaz asparaginowych zaprojektowano związki wykazujące bardzo duże powinowactwo do centrów aktywnych białek. Jednak te dobre wyniki osiągnięto tylko dla fosforowych analogów peptydów o znacznie wydłużonej sekwencji lub dla związków charakteryzujących się odpowiednio symetryczną strukturą, analogiczną do symetrycznej budowy miejsca aktywnego enzymu.



- 1** X = NH peptydy fosfonamidowe
2 X = O peptydy fosfonowe (fosfonopeptydy)
3 X = CH₂ peptydy fosfinowe (fosfinopeptydy)

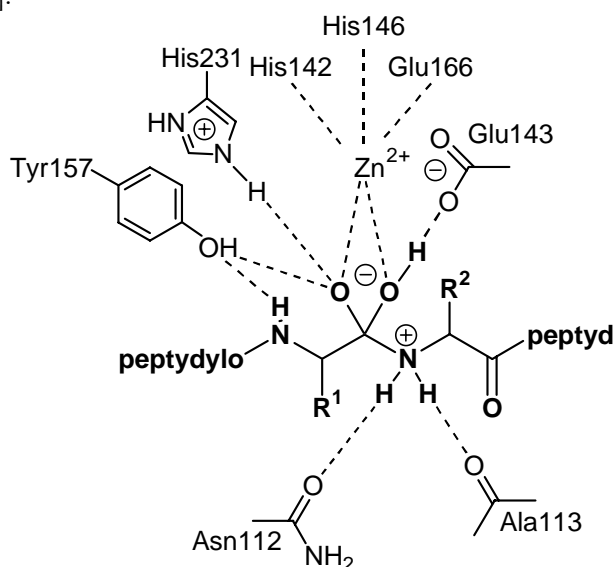
Rys. 1. Ogólne struktury fosfonamidowych (**1**, X = NH), fosfonowych (**2**, X = O) i fosfinowych (**3**, X = CH₂) analogów peptydów. Zaznaczono podstawniki P1 (R¹) oraz P1' (R²) potencjalnych inhibitorów wiązanych odpowiednio we wnękach S1 oraz S1' peptydaz zgodnie ze standardową nomenklaturą wprowadzoną przez Schechtera i Bergera [32]
 Fig. 1. General structure of phosphonamidate (**1**, X = NH), phosphonate (**2**, X = O) and phosphinate (**3**, X = CH₂) peptide analogues. P1 (R¹) and P1' (R²) substituents of potential inhibitors bound in the corresponding S1 and S1' pockets of peptidases are named according to the standard nomenclature introduced by Schechter and Berger [32]

Dla rodziny proteaz cysteinowych brak jest do tej pory spektakularnych wyników uzyskanych z użyciem fosforoorganicznych inhibitorów. W przypadku enzymów serynowych dobre wyniki dało natomiast zastosowanie innego typu fosforowych analogów peptydów – *P*-końcowych estrów difenylowych nieodwracalnie fosforylujących katalityczną resztę hydroksylową. Mimo tak różnorodnych, z perspektywy czasu, rezultatów osiągniętych dla poszczególnych grup peptydaz, koncepcja podobieństwa związków **1–3** do struktury stanu przejściowego wniosła ogromny wkład w rozwój podstawowej i praktycznej wiedzy o mechanizmach działania enzymów proteolitycznych, szczególnie metalozależnych. W takim właśnie kontekście: od zrozumienia molekularnych podstaw procesów katalizowanych przez metaloproteazy (na przykładzie termolizyny i karboksypeptydazy A) do praktycznego – terapeutycznego wykorzystania tej wiedzy (zastosowanie fosforoorganicznych inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę I) przedstawiono wprowadzenie do niniejszej pracy.

1.1. Fosfonamidowe i fosfinowe inhibitory wybranych metaloproteaz jako analogi stanu przejściowego enzymatycznej hydrolizy wiązania amidowego substratów peptydowych

Termolizyna (TLN, EC 3.4.24.27) – termostabilny enzym bakteryjny wyizolowany ze szczepu *Bacillus thermoproteolyticus* [33] – może być uważany za jeden z najbardziej reprezentatywnych przedstawicieli rodziny metaloproteaz cynkowych. Termolizyna to endo-

peptydaza o aktywności zależnej również od kationów wapnia. Stosunkowo wcześniej została poznana jej sekwencja aminokwasowa [34], a także struktura trzeciorzędowa na podstawie badań krystalograficznych wykonanych z dużą na ówczesne warunki rozdzielczością [35–39]. Należy podkreślić, że była to pierwsza metaloendopeptydaza, którą udało się otrzymać w formie krystalicznej i rozwiązać jej strukturę trójwymiarową. Kolejne studia rentgenograficzne dotyczące białka skompleksowanego z substratami oraz inhibitorami, w tym z fosforamidem **4** (tabela 1) – naturalnym dipeptydowym fosforamidem [40], umożliwiły zaproponowanie strukturalnych podstaw mechanizmu katalizowanej hydrolizy wiązania amidowego [41, 42]. Jego kluczowym etapem jest nukleofilowy atak atomu tlenu cząsteczki wody, spolaryzowanej między atomem cynku a grupą karboksylową reszty Glu143, na karbonylowy atom węgla hydrolizowanego wiązania amidowego. W natywnej termolizynie kation cynku jest koordynowany przez łańcuchy boczne trzech aminokwasów: His142, His146 oraz Glu166, a także przez cząsteczkę wody. Podczas wiązania substratu ta ostatnia jest przesuwana w stronę Glu143, tworząc parę wiązań wodorowych z resztą karboksylową. Zwiększa to znacznie jej nukleofilowość i ułatwia atak atomu tlenu na karbonylowy atom węgla wiązania peptydowego substratu. W wyniku tego powstaje wysokoenergetyczny, tetraedryczny, *gem*-diolowy produkt pośredni stabilizowany przez koordynację kationu cynku. Jednocześnie kwasowy proton reszty bocznej Glu143 zostaje przeniesiony na atom azotu tworzącej się grupy odchodzącej. Proponowany sposób wiązania substratu w stanie przejściowym dla termolizyny przedstawiono na rysunku 2 [41, 42].



Rys. 2. Proponowany schemat wiązania hydrolizowanego substratu peptydowego w stanie przejściowym do centrum aktywnego termolizyny

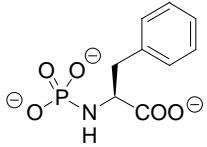
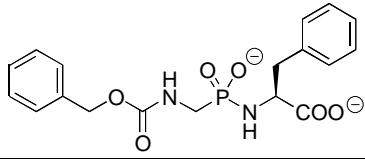
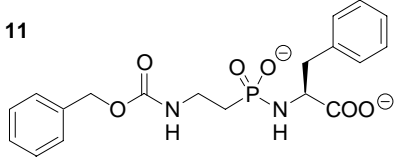
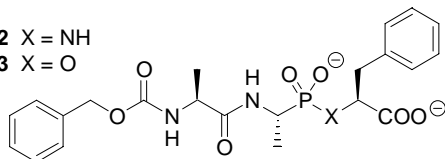
Fig. 2. Schematic representation of suggested binding mode of the transition state of the hydrolysed peptide substrate to the active site of thermolysin

Tabela 1. Reprezentatywne przykłady fosforamidowych oraz fosfonamidowych inhibitorów termolizyny
 Table 1. Representative examples of phosphoramidate and phosphonamidate inhibitors of thermolysin

	Inhibitor	K_i	Lit.
Fosforamidon	<p>4</p>	28 nM	[47,48]
P-Leu-NH ₂	<p>5</p>	1300 nM	[46]
P-Leu-Trp-OH	<p>6</p>	15 nM	[46]
Cbz-GlyP[NH]Leu-Leu-OH	<p>7</p>	9,1 nM	[49]
Cbz-PheP[NH]Leu-Ala-OH	<p>8</p>	0,068 nM	[50]

Karboksypeptydaza A (CPA, EC 3.4.17.1) może być uważana za odpowiednik termolizyny u organizmów wyższych. Jest to egzopeptydaza hydrolizująca wiązanie amidowe C-końcowego aminokwasu łańcucha oligopeptydowego. Pomimo że ani struktura pierwszorzędowa, ani struktury trzeciorzędowe CPA [43] i TLN [39] nie wykazują znaczącego wzajemnego podobieństwa, to rentgenografia ujawniła zaskakująco wiele analogii w architekturze centrów aktywnych obu metaloproteaz. Na przykład ułożenie kluczowej dla me-

Tabela 2. Reprezentatywne przykłady fosforamidowych oraz fosfonamidowych inhibitorów karboksypeptydazy A
 Table 2. Representative examples of phosphoramidate and phosphonamidate inhibitors of carboxypeptidase A

Inhibitor	K_i	Lit.
P-Phe-OH 9 	5000 nM	[46]
Cbz-GlyP[NH]Phe-OH 10 	90 nM	[51]
Cbz-Aep[NH]Phe-OH 11 	7 nM 1 nM (pH = 6,0)	[52]
Cbz-Ala-AlaP[NH]Phe-OH 12 X = NH 13 X = O 	0,032 nM (12) 0,0027 nM (13)	[53]

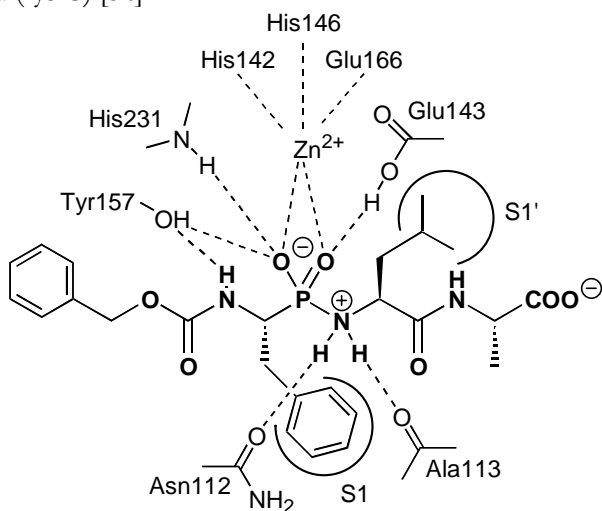
chanizmu hydrolizy reszty Glu143 TLN względem atomu cynku oraz wiązanego substratu ściśle koresponduje z pozycją odpowiedniej reszty Glu270 w CPA. Skutkiem tego jest zasadniczo identyczny mechanizm hydrolizy wiązania amidowego katalizowanej przez oba białka [44, 45]. Podobieństwa w budowie miejsc aktywnych powodują także zbliżoną specyficzność substratową względem aromatycznych i hydrofobowych aminokwasów wiązanych preferencyjnie we wnęce S1' obu enzymów.

Badanymi początkowo inhibitorami termolizyny i karboksypeptydazy A, zawierającymi wiązanie P-N, były fosforamidy (*N*-fosforylowane aminokwasy oraz krótkie peptydy) [46]. Reprezentatywne przykłady takich struktur podano odpowiednio w tabelach 1 i 2. *N*-Fosforylowe pochodne hydrofobowych aminokwasów (**5** oraz **9**) umiarkowanie hamowały aktywność enzymów, z wartościami K_i rzędu 1–5 μ M. Rozbudowa *C*-końca o resztę tryptofanu do dipeptydu **6** analogicznego do fosforamidonu **4**, spowodowała zwiększenie powinowactwa tego związku względem termolizyny o dwa rzędy wielkości w porównaniu do powinowactwa pochodnej aminokwasowej **5**. Jednocześnie P-Leu-Trp-OH **6** okazał się bardziej aktywny niż sam fosforamidon – naturalny inhibitor metaloproteaz, w tym termolizyny [47, 48], dowodząc, że do efektywnego kompleksowania atomu cynku

w miejscu aktywnym konieczne jest odblokowanie atomów tlenu fosforamidu (podobnie fosfonamidu) dające możliwość utworzenia specyficznych wiązań wodorowych.

Wprowadzenie wiązania P–N do wnętrza łańcucha peptydu i otrzymanie „pełnych” pseudopeptydowych analogów fosfonamidowych spowodowało kolejny, jakościowy wzrost aktywności tak zmodyfikowanych związków, wykazujących często K_i w granicach subnanomolarnych. Otworzyło to drogę do rozwoju i opracowania grupy dezaktywatorów proteaz, zwłaszcza metalozależnych (w tym termolizyny i karboksypeptydazy A, związki **7**, **8**, **10–13**, tabele 1 i 2), należących do najsilniejszych spośród poznanych dotychczas inhibitorów enzymów (patrz także rozdział 5).

Jak udowodniono, rozwiązując strukturę krystaliczną termolizyny skompleksowanej związkiem **8** (Cbz–PheP[NH]Leu–Ala–OH), inhibitor fosfonamidowy niezwykle wiernie naśladuje postulowany sposób wiązania *gem*-diolowego stanu przejściowego w centrum aktywnym enzymu (rys. 3) [54].



Rys. 3. Postulowany sposób wiązania fosfonamidowego inhibitora – Cbz–PheP[NH]Leu–Ala–OH **8** w centrum aktywnym termolizyny [54]

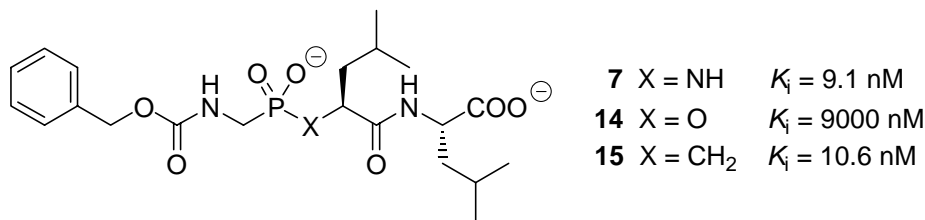
Fig. 3. Schematic representation of the suggested binding mode of the phosphoramidate inhibitor – Cbz–PheP[NH]Leu–Ala–OH **8** in the active site of termolysin [54]

Na podstawie analizy oddziaływań można stwierdzić, że oba fosfonylowe atomy tlenu rzeczywiście kompleksują pięciokoordynacyjny atom cynku. Zwiększenie długości wiązania fosfor–azot sugeruje natomiast, że atom azotu jest sprotonowany podobnie jak w przypadku grupy odchodzącej substratu. Kompleks enzym–inhibitor jest stabilizowany siecią wiązań wodorowych, także poza ścisłym centrum miejsca katalitycznego odtwarzając niezwykle dokładnie interakcje substratu z białkiem. Dotyczy to również reszty karbaminianowej oddziałującej z grupą amidową Trp115 termolizyny. Dzieje się tak tylko w przypadku obecności odpowiednich reszt bocznych inhibitora zajmujących hydrofobowe wnęki wiążące enzymu, tak jak dla związku **8**. Natomiast w przypadku analogu **7**

(Cbz–GlyP[NH]Leu–Leu–OH), który zawiera mniej rozbudowane łańcuchy boczne i wykazuje większą swobodę rotacji w regionie S1–S2, obserwuje się odmienne ułożenie cząsteczki inhibitora. Przyczyną tego jest insercja cząsteczki wody między grupę karbaminową a fragment białkowy [54]. Nie ma zupełnej jasności, czy ma to także swoje odzwierciedlenie w kinetyce wiązania obu inhibitorów do termolizyny. Niezwykle aktywny analog **8** ($K_i = 0,068$ nM) charakteryzuje się bardzo wolnym wiązaniem zgodnym z kinetyką drugiego rzędu $k_{on} = 10^3$ M⁻¹ · s⁻¹, podczas gdy znacznie mniej aktywny związek **7** ($K_i = 9,1$ nM) wykazuje odpowiednią stałą kinetyczną k_{on} przekraczającą 10^5 M⁻¹ · s⁻¹ [50]. Ponieważ początkowo wykluczono jakiegokolwiek zmiany konformacyjne czy izomerizację białka różnicujące wiązanie obu inhibitorów, kluczową rolę przypisano wspomnianej cząsteczce wody [50]. Dla analogów bardzo ściśle wiążących się z enzymem niezbędne jest jej usunięcie z centrum aktywnego, co prowadziło do zmiany kinetyki procesu. Późniejsze badania sugerują natomiast, że w pierwotnie otrzymanych strukturach krystalicznych termolizyny, uważanych za formy natywne, obecny był jednak skompleksowany dipeptyd [55, 56]. Nie można zatem wykluczać zmian konformacyjnych enzymu podczas wiązania ligandu. Należy jednak podkreślić, że kinetyka wolno wiążąca jest obserwowana dla wielu innych metaloproteaz i ich fosforoorganicznych inhibitorów [57–59].

Również dla karboksypeptydazy A zaobserwowano nietypowy sposób wiązania inhibitora **10** (Cbz–GlyP[NH]Phe–OH) mającego resztę glicyny, a więc wykazującego związaną z tym swobodę rotacji we fragmencie P1–P2. W tym przypadku zmiana konformacyjna polega na ulokowaniu grupy benzyłowej reszty karbaminianu wewnątrz wnęki wiążącej S1 enzymu [60].

Fosfonamidowe analogi peptydów odegrały niezwykle ważną rolę w procesie zrozumienia strukturalnych uwarunkowań mechanizmów funkcjonowania enzymów dwóch prototypicznych metaloproteaz: termolizyny oraz karboksypeptydazy A [44, 45]. W drugiej połowie lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku fakt ten spowodował, że konstrukcja inhibitorów regulujących aktywność różnorodnych peptydaz zaczęła wykazywać ważny aspekt praktyczny. Enzymy proteolityczne, których znaczenie w fizjologii, a także w różnorodnych patologiach intensywnie studiowano, stały się bowiem potencjalnymi celami projektowania środków terapeutycznych. W tym zakresie fosfonamidy nie spełniły pokładanych w nich oczekiwań. Mimo że są niezwykle aktywne, okazały się trudne w syntezie, a przede wszystkim obarczone niemożliwą do wyeliminowania wadą ograniczonej trwałości hydrolitycznej wiązania P–N (patrz rozdz. 3). Fosfonodepsipeptydy (zawierające wiązanie P–O), wybitnie aktywne, np. względem karboksypeptydazy A [53, 61], w innych przypadkach nie wykazywały już tak silnego powinowactwa do metaloproteaz. Coraz większą wagę zaczęto więc przywiązywać do rozwoju chemii fosfinopeptydów, w których labilne wiązanie P–N zastąpione zostało trwałym P–C. Co ciekawe, dla termolizyny powodowało to tylko nieznaczne zmniejszenie aktywności związków, mimo że analogia do stanu przejściowego hydrolizy wiązania amidowego wydawała się być bardziej odległa. Taką zależność struktura–aktywność dobrze opisuje przykład serii analogów Cbz–GlyP[X]Leu–Leu–OH, inhibitorów TLN (rys. 4) [62–66].



Rys. 4. Porównanie aktywności fosforoorganicznych analogów tripeptydu Cbz-GlyP[X]Leu-Leu-OH względem termolizyny
 Fig. 4. Comparison of the activities of phosphorus tripeptide analogues Cbz-GlyP[X]Leu-Leu-OH towards thermolysin

Badania krystalograficzne udowodniły, że analog fosfonamidowy Cbz-GlyP[NH]Leu-Leu-OH **7** o największej aktywności ($K_i = 9,1 \text{ nM}$) wykazuje praktycznie identyczny sposób wiązania z enzymem jak prawie o trzy rzędy słabszy inhibitor fosfonowy **14** ($K_i = 9000 \text{ nM}$) [62]. Po skompleksowaniu inhibitorów przez termolizynę obie struktury wykazują tylko jedną różnicę – fosfonamidowy atom azotu związku **7** tworzy dodatkowe wiązanie wodorowe z grupą karbonylową Ala113 szkieletu białka, podczas gdy fosfonian **14** nie ma takiej możliwości. Różnice w swobodnej energii wiązania obu analogów: wyznaczona z wartości stałych kinetycznych (4,0 kcal/mol) [63] oraz obliczona teoretycznie metodami dynamiki molekularnej (4,2 kcal/mol) [64] dobrze korelują ze sobą i obrazują zysk energetyczny pochodzący z tego pojedynczego, specyficznego oddziaływania.

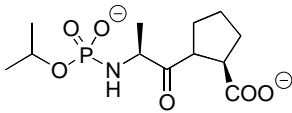
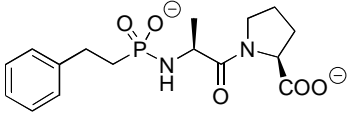
Zaskakująco, fosfinopeptyd o identycznej sekwencji **15**, który również nie ma możliwości tworzenia takiego wiązania wodorowego, okazał się znacznie bardziej aktywny ($K_i = 180 \text{ nM}$ według pracy Galardy i in. [65]) niż odpowiedni fosfonian **14**. Próbuąc to uzasadnić, Galardy i współpracownicy zaproponowali zmniejszony do 1,5 kcal/mol udział wiązania wodorowego w swobodnej energii wiązania inhibitorów. Obserwowane dysproporcje w wartościach stałych K_i miały być spowodowane dodatkowym wpływem zasadowości badanych analogów, wzrastającej w szeregu: fosfonian < fosfonamid ~ fosfinopeptyd, co miało wpływać na efektywność interakcji z kationem cynku [65]. Niestety otrzymane wyniki, zarówno dotyczące aktywności Cbz-GlyP[CH₂]Leu-Leu-OH **15** (badanego jako mieszanina diastereoizomerów), jak i porównanie zasadowości pseudo-peptydów, okazały się nie do końca precyzyjne i zostały ostatecznie skorygowane przez Bartletta [66]. Zgodnie z tymi danymi eksperymentalnymi ($K_i = 10,6 \text{ nM}$ dla związku **15**) fosfonamidy oraz fosfinopeptydy wykazują podobne powinowactwo względem termolizyny, a różnica w zachowaniu w porównaniu do analogów fosfonowych jest spowodowana stratami entropowymi wywołanymi desolvatacją związków **7**, **14** i **15** podczas wiązania z enzymem. Dla fosfonamidu **7** strata entropii spowodowana zerwaniem wiązania wodorowego z cząsteczką wody w roztworze jest rekompensowana zyskiem energetycznym z powstawania nowego wiązania wodorowego z grupą karbonylową Ala113. W przypadku fosfinopeptydu **14** mamy do czynienia tylko z niekorzystnym udziałem procesu desolvatacji (strata energii desolvatacji nie jest w pełni rekompensowana przez zmniejszenie

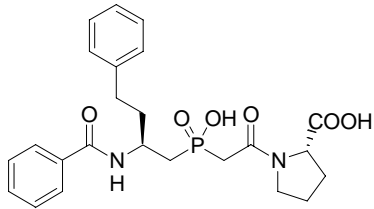
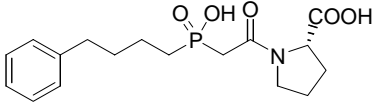
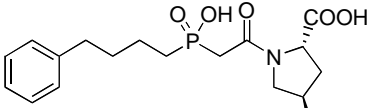
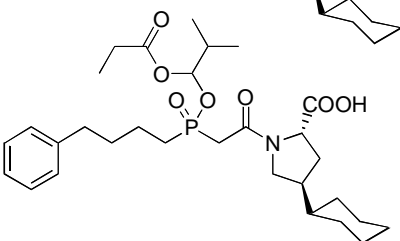
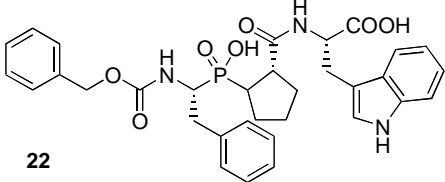
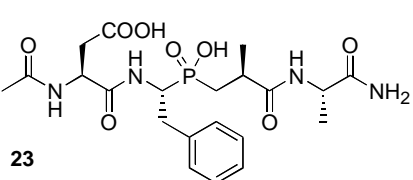
entropii układu). Koresponduje to z różnicą w obliczonej na nowo swobodnej energii wiązania (2,7 kcal/mol), a wynikiem jest znacząca dysproporcja aktywności związków **7** oraz **14**. Dla grupy $-\text{CH}_2-$ fosfinopeptydu **15** nie zachodzi natomiast ani desolvatacja, ani tworzenie nowych oddziaływań wodorowych. Tak jak dla fosfonamidu **7**, różnica zrywanych i powstających wiązań wynosi zatem zero, stąd zbliżona aktywność obu analogów dobrze korelująca z minimalną różnicą w energii wiązania (0,1 kcal/mol) [66].

1.2. Praktyczne aspekty wykorzystania fosfinopeptydowych inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę

Szczegółowo przedyskutowane wyniki hamowania aktywności termolizyny przez stabilne chemicznie fosfinopeptydy znalazły swoje odzwierciedlenie w poszukiwaniu związków regulujących działanie innych metaloproteaz, także w kontekście ich praktycznego – terapeutycznego zastosowania. Dobrym przykładem takiego procesu może być opracowanie fosinoprilatu – inhibitora enzymu konwertującego angiotensynę I, a jednocześnie jedyne analogu fosfinopeptydowego, który stał się handlowo dostępnym farmaceutykiem. Enzym konwertujący angiotensynę (ACE, EC 3.4.15.1) to proteaza katalizująca hydrolizę C-końcowego dipeptydu w substratach oligopeptydowych. Jej podstawową rolę fizjologiczną jest przemiana angiotensyny I w angiotensynę II oraz hydroliza bradykininy, dwóch peptydowych hormonów będących produktami ściśle regulowanych kaskad proteolitycznych: reninowo-angiotensynowej i kininowo-kalikreinowej, odgrywających kluczową rolę w regulacji ciśnienia krwi, funkcji sercowo-naczyniowych i gospodarce elektrolitami. ACE, będąc podstawowym celem dla działania leków na nadciśnienie tętnicze krwi, stanowi jednocześnie jedną z głównych metaloproteaz o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

Tabela 3. Reprezentatywne przykłady fosforamidowych, fosfonamidowych oraz fosfinowych inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę I
Table 3. Representative examples of phosphoramidate, phosphonamidate and phosphinate inhibitors of angiotensin I converting enzyme

Inhibitor	Aktywność inhibitorowa: K_i lub IC_{50}	Lit.
$(i\text{-PrO})\text{-P-Ala-Pro-OH}$ 16 	$K_i = 1,4 \text{ nM}$	[67]
$\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{P}[\text{NH}]\text{Ala-Pro-OH}$ 17 	$IC_{50} = 7 \text{ nM}$ $K_i = 0,5 \text{ nM}$	[68, 69] [70]

<p>18</p> 	<p>$IC_{50} = 12 \text{ nM}$</p>	<p>[71]</p>
<p>19</p> 	<p>$IC_{50} = 180 \text{ nM}$</p>	<p>[71]</p>
<p>Fosinoprilat</p> <p>Fosinopril</p>	<p>20</p>  <p>21</p> 	<p>$K_i = 1,5 \text{ nM}$</p> <p>[72]</p>
<p>Cbz-PheP[CH₂]Pro- -Trp-OH</p> <p>Ac-Asp-PheP[CH₂]Ala- -Ala-NH₂</p>	<p>22</p>  <p>23</p> 	<p>$K_i = 10000 \text{ nM}$ (domena N-końcowa) $K_i = 3 \text{ nM}$ (C-końcowa)</p> <p>$K_i = 7 \text{ nM}$ (domena N-końcowa) $K_i = 7500 \text{ nM}$ (C-końcowa)</p> <p>[75-77]</p>

Już pierwsze spośród fosforamidowych (np. związek **16**) oraz fosfonamidowych (np. związek **17**) pochodnych dipeptydu H-Ala-Pro-OH okazały się niezwykle interesującymi dezaktywatorami enzymu konwertującego angiotensynę (tabela 3) [67-70]. Biorąc jednak pod uwagę labilność hydrolytyczną wiązania P-N, a także zbliżone powinowactwo różnych fosforoorganicznych analogów do ACE (P-N ~ P-C), w laboratoriach firmy Squibb skoncentrowano się na pochodnych fosfinowych, otrzymując podobnie aktywne związki, np. **18** [71]. Związek **19**, o uproszczonej budowie, charakteryzował się co prawda zmniejsz-

szeniem potencji, ale wykazywał bardzo obiecujące charakterystyki farmakokinetyczne w badaniach *in vivo* [71]. Optymalizacja jego struktury przez podstawienie reszty proliny w pozycji 4 doprowadziła w rezultacie do opracowania fosinoprilatu **20**, związku o znacznie zwiększonej aktywności *in vivo* w stosunku do **19** [72]. Jego jedyną wadą była słaba przyswajalność z układu pokarmowego, co wyeliminowano, syntezując związek w formie proleku – fosinoprilu **21**. W organizmie acyloksyester fosfinowy **21** jest hydrolyzowany do wolnego kwasu przez odpowiednie esterazy. Aktywny składnik – fosinoprilat nie ulega dalszemu metabolizmowi i charakteryzuje się długim czasem eliminacji, utrzymując obniżenie ciśnienia krwi w ciągu 24 godzin od przyjęcia dawki [73, 74].

Powszechniej występująca, somatyczna izoforma enzymu konwertującego angiotensynę zawiera dwie domeny katalityczne (*N*- oraz *C*-terminalną) charakteryzujące się wysokim stopniem podobieństwa sekwencji aminokwasów. Dochodzi ono do prawie 90% biorąc pod uwagę 40 reszt kluczowych do tworzenia centrów aktywnych poszczególnych domen. Dlatego też wykazują one niezwykle zbliżoną specyficzność substratową, a jednym z niewielu przykładów peptydu hydrolyzowanego specyficznie (około 50 razy szybciej przez *N*-końcową domenę) jest Ac-Ser-Asp-Lys-Pro-OH [78]. Tym większe wyzwanie stanowiło opracowanie syntetycznych inhibitorów wykazujących specyficzne powinowactwo do poszczególnych centrów aktywnych. Jest to możliwe dzięki opracowaniu strategii zastosowania fosfinopeptydów w chemii kombinatorycznej [79–81]. Systematyczne badanie bibliotek tripeptydów oraz tetrapeptydów fosfinowych, zawierających wolne lub blokowane *N*- i *C*-końce doprowadziło do identyfikacji bardzo selektywnych związków (**22** oraz **23**) względem obu homologicznych domen ACE [75–77]. Charakteryzowały się one różnicą trzech rzędów wielkości w wartościach odpowiednich stałych kinetycznych K_i (tabela 3), a co więcej, wykazywały interesującą selektywność względem innych metaloproteaz [75, 77].

Na przykładzie enzymu konwertującego angiotensynę pokazano kolejne zalety zastosowania fosfinowych inhibitorów metaloproteaz w porównaniu z ich odpowiednikiem fosfonamidowym. Podsumowując, należy podkreślić, że stabilność chemiczna układu C–P–C w przypadku tych pierwszych otworzyła szerokie możliwości syntetyczne polegające na wydłużaniu ich sekwencji oraz modyfikacji reszt bocznych, zarówno z zastosowaniem standardowej syntezy na stałym nośniku, syntezy równoległej, jak i syntezy kombinatorycznej (patrz rozdz. 4) [79–82]. Dla porównania, w literaturze istnieje tylko jedno doniesienie dotyczące otrzymania pseudopeptydów fosfonamidowych na stałym nośniku [83]. Fosfinowe inhibitory metaloproteaz odznaczają się nie tylko dużą aktywnością, ale także bardzo interesującą selektywnością. Przyczyną tego jest możliwość zoptymalizowania ich struktury po obu stronach grupy koordynującej kation metalu, czyli oddziaływać względem całego centrum aktywnego receptora. W odróżnieniu od inhibitorów fosfinowych, związki zawierające ugrupowania silniej kompleksujące kation cynku, ale jednostronnie podstawione, np.: tiole lub kwasy hydroksamowe generalnie wykazują mniejszą selektywność oddziaływać. Jak pokazały testy *in vivo* oraz badania radiograficzne, fosfinopeptydy wyróżniają się obiecującą charakterystyką farmakokinetyczną [75, 77, 84]. Mimo

istnienia dodatkowych wiązań peptydowych (także amidowych oraz karbaminianowych) w ich strukturze, nie są one metabolizowane przez niespecyficzne proteazy w organizmie. Nienaruszone podlegają ekskrecji standardowymi drogami wydalania. Wyniki badań rentgenograficznych kompleksów fosfinopeptydów z takimi metaloproteazami, jak: astacyna [85], stromelizyna-3 [86] i termolizyna [87] pokazały natomiast, że zgodnie z założeniami wiążą się one jako analogi stanu przejściowego hydrolizy substratów peptydowych. Reszta fosfinowa odtwarza sposób kompleksowania atomu cynku przez *gem*-diolowe intermediały w odpowiednich centrach aktywnych. Co więcej, połączony z nią tetraedryczny atom węgla prawdopodobnie lepiej naśladuje geometrię uprotonowanej reszty aminowej grupy odchodzącej. Badania NMR w cieple stałym kompleksu termolizyna-inhibitor pokazały bowiem, że w przypadku fosfonamidów to postulowane poprzednio uprotonowanie [54] nie występuje [88]. Dodatkowo, proton reszty P-CH₂ może tworzyć słabe wiązanie wodorowe typu C-H...O=C z grupą karbonylową białka (np. astacyny oraz stromelizyny-3 [85,86], upodabniając się tym samym do oddziaływań charakterystycznych dla grupy P-NH.

Aktualność tematyki oraz ciągły rozwój metod syntezy fosfinopeptydów w kontekście ich zastosowania jako efektywnych inhibitorów metaloproteaz cynkowych sprawiły, że stały się one przedmiotem wielu najnowszych przeglądów literaturowych [58, 89–92]. Badania dotyczące otrzymywania nowych inhibitorów tego typu oraz ich aktywności względem wybranych enzymów stanowią także treść rozdziałów 4 i 5 niniejszej rozprawy.

1.3. Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest zaprezentowanie dokonań autora dotyczących syntezy pseudopeptydów fosfonamidowych oraz fosfinowych, badania ich stabilności, reaktywności chemicznej, a także przedstawienie wyników aktywności biologicznej związków względem wybranych metaloproteaz, na tle aktualnych postępów w tej dziedzinie. Realizacja wybranej tematyki wymagała postawienia i rozwiązania odpowiednich szczegółowych problemów badawczych. W pierwszym etapie obejmowały one głównie opracowanie metod syntezy *N*-chronionych α -aminoalkanofosfonianów jako bezpośrednich substratów służących do otrzymywania tytułowych analogów peptydów, także enancjo- oraz diastereoizomerycznie czystych. W związku z tym, zaplanowano dodatkowo przetestowanie odpowiednich dyskryminatorów chiralności, takich jak cyklodekstryny czy alkaloidy chinolinowe, do kontroli czystości optycznej tych prekursorów z zastosowaniem prostych, szybkich i wiarygodnych metod, głównie techniki ³¹P NMR. W dalszej części założono zbadanie przebiegu tworzenia wiązania fosfonamidowego w reakcji wiodącej przez odpowiednie fosfonochlorki, a także studia dotyczące reaktywności związków P-N. Z powodu istotnych niespójności i niekonsekwencji panujących w literaturze naukowej, największą uwagę zamierzano skoncentrować na całościowym wyjaśnieniu ich labilności hydrolytycznej w powiązaniu ze strukturą oraz pH. W syntezie fosfinopeptydów najwięk-

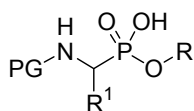
szy nacisk położono natomiast na uzyskaniu docelowych związków, stanowiących bardzo efektywne i selektywne inhibitory wybranych metaloproteaz, takich jak: matryksyny oraz leucyloaminopeptydazy. Wymagało to opracowania odpowiednich metod syntetycznych, służących zarówno do modyfikacji podstawników w analogach pseudodipeptydów, jak i wydłużania sekwencji aminokwasowej. Do optymalizacji struktur tych związków, a tym samym ich oddziaływań z receptorem, zaplanowano użycie najnowszych narzędzi wspomagających proces opracowania związków biologicznie aktywnych, w tym: syntezy kombinatorycznej oraz modelowania molekularnego.

Otrzymane wyniki badań podzielono na cztery części odpowiadające kolejnym rozdziałom: od 2 do 5. Każdy z nich zachowuje jednolitą strukturę prezentacji. W ogólnym wstępie przedstawiony jest obecny stan wiedzy dotyczący danej tematyki. Ze względu na obszerność dostępnej literatury niektóre fragmenty oparte są na reprezentatywnym wyborze dokonany przez autora. W podrozdziałach przedstawiono wyniki badań własnych autora. Numeracja związków jest konsekwentna w całej pracy, niemniej jednak najważniejsze struktury otrzymane przez autora ujęte są dodatkowo w ramkach.

2. Monoestry kwasów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkanofosfonowych oraz *H*-fosfinowych jako substraty w syntezie fosforowych analogów peptydów

Podstawowymi substratami w syntezie fosforowych mimetyków dipeptydów są odpowiednie pochodne kwasów α -aminoalkanofosfonowych i α -aminoalkano-*H*-fosfinowych (fosfonawych) przedstawione ogólnymi wzorami **24** i **25** (rys. 5). *N*-Blokowane monoestry aminofosfonowe **24** to podstawowe prekursory pseudopeptydów zawierających wiązania fosfonamidowe a także fosfonodepsipeptydów. Te dwie grupy związków są otrzymywane przez aktywację funkcji kwasowej **24** pozwalającą na fosforylowanie odpowiednich nukleofili: amin (aminoestrów) lub alkoholi (hydroksyestrów) (patrz rozdz. 3). *N*-podstawione kwasy amino-*H*-fosfinowe **25** (R = H) lub ich estry **25** (R = alkil, benzyl) to przede wszystkim substraty do otrzymywania fosfinopeptydów (patrz rozdz. 4). Te drugie są także rzadziej używane do tworzenia wiązań P–N oraz P–O na drodze oksydacyjnego sprzęgania z odpowiednimi nukleofilami (reakcja Athertona–Todd’a).

N-Blokowane monoestry
 α -aminoalkanofosfonowe

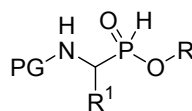


24

PG = Boc, Cbz, Fmoc

R = alkil, benzyl

N-Blokowane kwasy (estry)
 α -aminoalkano-*H*-fosfinowe



25

R = H, alkil, benzyl

Rys. 5. Struktury najczęściej używanych fosfonowych i fosfinowych substratów w syntezie fosforowych analogów peptydów
Fig. 5. Structures of phosphonate and phosphinate substrates used most frequently in synthesis of phosphorus peptide analogues

Zależnie od używanych procedur syntezy i deprotekcji blokowanych pseudopeptydowych produktów najczęściej stosowane obecnie reszty ochronne grupy aminowej to pochodne karbaminianowe: Boc – *t*-butyloksykarbonylowa, Cbz – benzyloksykarbonylowa oraz Fmoc – 9-fluorenylometoksykarbonylowa. Rzadziej wykorzystuje się początkowo najpopularniejszą resztę ftalilową (Pht) i tylko sporadycznie inne metody maskowania grup aminowych, np. w formie azydków. Grupy estryfikujące resztę fosfonową (fosfino-

wą) to przede wszystkim labilne w warunkach zasadowej hydrolizy lub katalitycznej hydrogenolizy, odpowiednio: proste analogi alkilowe (Me, Et) lub benzylowe (Bz).

Dwu- lub trzyetapowa procedura syntezy tego typu związków polega na *N*-acylowaniu wyjściowych α -aminofosfonianów, a następnie estryfikacji reszty fosforowej. α -Aminofosfoniany to łatwo obecnie dostępne analogi aminokwasów, a szeroki rozkwit różnorodnych metod ich otrzymywania wiąże się z potencjalnymi zastosowaniami związanymi z ich aktywnością biologiczną (inhibitory enzymów, środki antybakteryjne, efekторы neurotransmisji), agrochemiczną (efektory wzrostu roślin), a także jako związków kompleksujących jony metali. Tematyka ta została podsumowana w wielu pracach przeglądowych oraz monografiach [93–98] i nie wchodzi w zakres niniejszej rozprawy. Bazując na tych substratach, opracowano i opisano w literaturze wiele metod odpowiedniej ochrony ich grup funkcyjnych. Reprezentatywne przykłady takich reakcji zebrano w tabeli 4.

Tabela 4. Reprezentatywne literaturowe przykłady ochrony grup funkcyjnych w α -aminoalkanofosfonianach stosowanych jako substraty w syntezie fosforowych analogów peptydów
Table 4. Representative literature examples of protection of the functional groups in α -aminoalkanephosphonates as substrates in synthesis of phosphorus peptide analogues

Rodzaj ochrony	Grupa ochronna lub typ reakcji, warunki, literatura
<i>N</i> -Blokowanie kwasów α -aminoalkanofosfonowych	<i>N</i> -Boc: BocN ₃ lub Boc ₂ O / NEt ₃ [99, 100] <i>N</i> -Cbz: CbzCl / zasada nieorganiczna (NaOH, LiOH, NaHCO ₃ / K ₂ CO ₃ , itp.) [101-103]
<i>N</i> -Blokowanie kwasów α -aminoalkano- <i>H</i> -fosfinowych	<i>N</i> -Boc: Boc ₂ O / NEt ₃ [104] <i>N</i> -Cbz: CbzCl / NaOH [105] <i>N</i> -Fmoc: FmocOSu lub FmocCl / Na ₂ CO ₃ [106–108]
Otrzymywanie fosfonowych estrów monoalkilowych i monobenzylowych	Hydrolityczne i niehydrolityczne rozszczepienie odpowiednich diestrów przy użyciu np.: NaOH [51], HBr, PBr ₃ , LiBr, PhSNa [109], NaI [110], TMSBr [111], <i>t</i> -BuNH ₂ [112], chinuklidyny, DABCO [113] Monoestryfikacja z użyciem jednego równoważnika alkoholu i czynnika aktywującego, np.: DCC [102], BroP [114], SOCl ₂ [115], Cl ₃ CCN [116] lub zastosowanie diazometanu CH ₂ N ₂ [117] Utlenianie estrów fosfinowych: NaIO ₄ [118], CCl ₄ , H ₂ O / NEt ₃ [119]
Estryfikacja kwasów fosfinowych	Estryfikacja z użyciem odpowiedniego alkoholu i czynnika aktywującego, np.: DCC [118], EDC [120] lub zastosowanie innych reagentów estryfikujących, np.: P(OMe) ₃ [121], CH ₂ N ₂ [122]

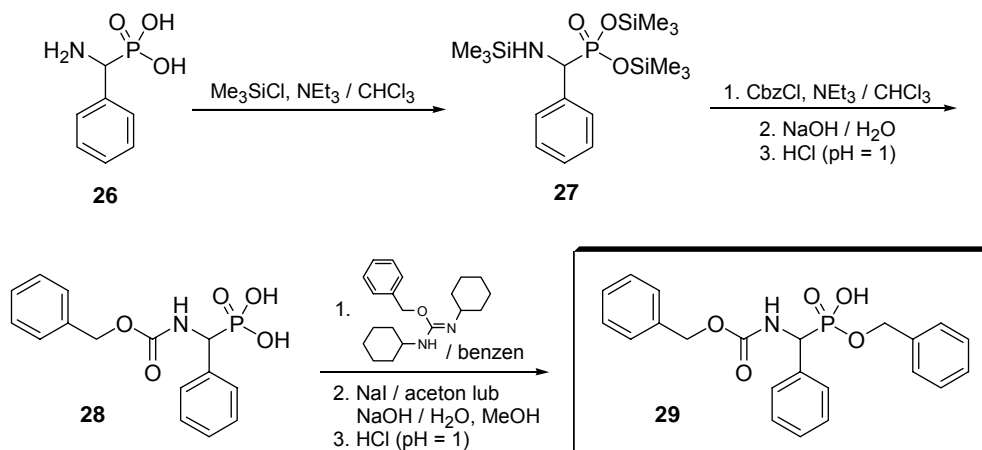
N-Acylowanie, przeprowadzane standardowo w obecności zasady organicznej lub nieorganicznej, zawsze poprzedza reakcję funkcjonalizacji reszty fosforowej kwasów α -aminoalkanofosfonowych. Ostatnia modyfikacja może być dokonywana na kilka sposobów. Najczęściej używaną metodą jest monohydroliza odpowiednich diestrów dostępnych

z dużą wydajnością, np. w reakcji kwasów z ortomrówczanem trialkilowym [123], *O*-benzyl-*N,N'*-dicykloheksyloizomocznikiem [110] czy diazometanem [117]. Rzadziej stosowanym wariantem syntezy jest bezpośrednia monoestryfikacja z użyciem klasycznych środków sprzęgających, takich jak karbodiimidy czy pochodne benzotriazolu, wykorzystująca różnice w reaktywności dwuzasadowej reszty fosfonowej ($pK_{a1} \sim 0,5 - 1,5$, $pK_{a2} \sim 5,0 - 6,0$). Interesującym pomysłem okazało się też utlenianie estrów odpowiednich kwasów *H*-fosfinowych. Ze względu na monozasadowość fosfinowej reszty kwasowej, a zatem możliwość zastosowania nadmiaru reagentów do ich estryfikacji, wydają się one być substratami relatywnie łatwiej dostępnymi. Ta droga syntezy jest jednak tylko sporadycznie wykorzystywana i cytowana w literaturze.

Mimo że procedury protekcji i deprotekcji α -aminoalkanofosfonianów stały się w pewnym stopniu standardowe (tabela 4), warto zwrócić uwagę, że często towarzyszą im nieoczekiwane reakcje uboczne, a także obserwuje się znaczne różnice w reaktywności i zachowaniu analogów fosfonowych względem fosfinowych. Pokazują to przedstawione wyniki badań własnych autora.

2.1. Synteza *N*-benzylotykarbonylo- α -aminoalkanofosfonianów monoalkilowych

Najbardziej szczegółowo opisaną ilustracją wspomnianych różnic wydaje się być synteza *N*-benzylotykarbonylowych monoestrów benzylowych – fosfonowych i fosfinowych analogów fenyloglicyny [124]. O ile acylowanie kwasów α -aminoalkanofosfinowych

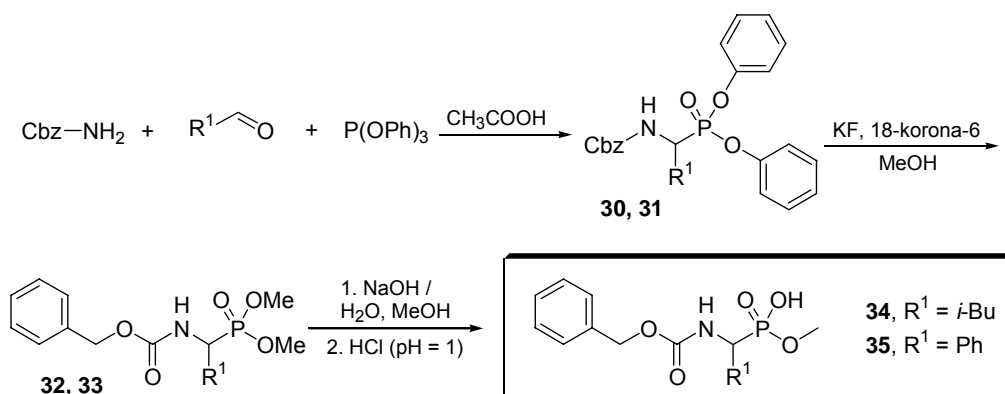


Schemat 1. Procedura syntezy monoestru benzylowego kwasu *N*-benzylotykarbonylo- α -aminofenylometanofosfonowego

Scheme 1. Synthesis leading to benzyl *N*-benzylotykarbonylo- α -aminofenylmethanephosphonate monoester

przebiega bez przeszkód w warunkach wodnych [105], o tyle analogiczna reakcja dla kwasów fosfonowych, wbrew doniesieniom literaturowym [101–103], pozwalała otrzymać oczekiwany produkt jedynie z niewielką wydajnością. Najbardziej prawdopodobną przyczyną tych problemów jest tworzenie się analogu mieszanego bezwodnika między grupą fosfonową aminofosfonianu, a resztą czynnika acylującego, który ulega następnie hydrolizie w obecności wody. Dopiero opracowana modyfikacja metody, polegająca na poprzedzającym acylowanie wyczerpującym siliowaniu substratu aminokwasowego **26** w warunkach bezwodnych okazała się skuteczna (schemat 1) [124]. Etap estryfikacji z użyciem *O*-benzylo-*N,N'*-dicykloheksyloizomocznika [110] przebiegał już bez przeszkód. Otrzymany diester łatwo ulegał monohydrolizie w zasadowych warunkach lub z użyciem jodku sodu, dając docelowy związek **29**.

W podobny sposób otrzymano również odpowiednie monoestry etylowe. W tym przypadku zastosowano metodę hydrolizy diestrów powstających w wyniku działania ortomrówczanem trietylu na *N*-benzyloksykarbonylową pochodną **28**. Zsyntezowane związki zostały użyte do otrzymywania dipeptydów zawierających wiązanie fosfonamidowe. Badano mechanizm ich tworzenia oraz reaktywność produktów (patrz rozdz. 3) [125, 126].



Schemat 2. Procedura syntezy monoestrów metylowych kwasów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkanofosfonowych z wykorzystaniem transestryfikacji estrów difenyloowych

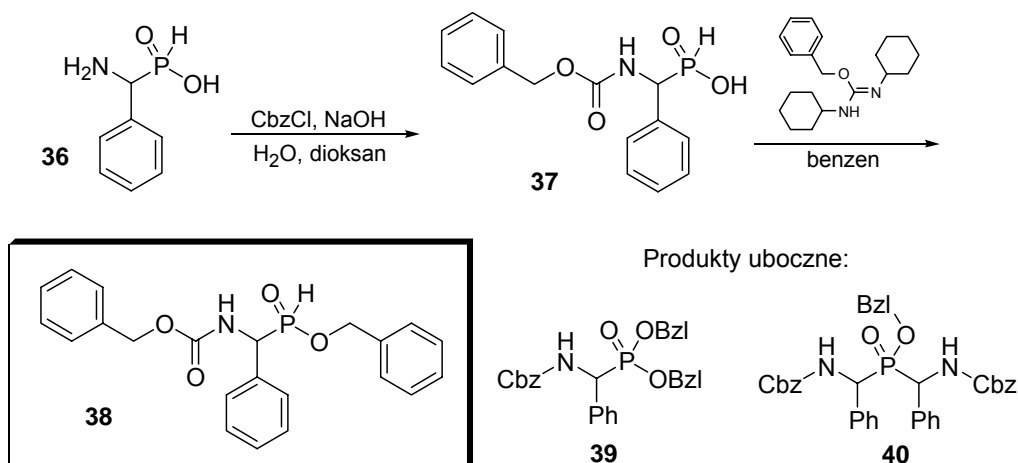
Scheme 2. Synthesis leading to methyl *N*-benzyloxycarbonyl- α -aminophenylmethanephosphonate monoesters with use of transesterification of diphenyl phosphonate esters

Interesującą modyfikacją metody syntezy monoestrów fosfonowych poprzez selektywną hydrolizę okazała się często cytowana, np. [127, 128] transestryfikacja estrów difenyloowych (schemat 2). Podstawową zaletą omawianego rozwiązania jest to, że omija się najbardziej zawodny etap *N*-acylowania aminokwasu, ponieważ blokowane difenylofosfoniany, np.: **30**, **31**, otrzymuje się w dogodnej trójskładnikowej reakcji kondensacji aldehydu, karbaminianu benzylu i fosforynu trifenylowego opisaną przez Oleksyszyna [129]. Transestryfikacja

przebiega w nadmiarze alkoholu, w obecności fluoru potasu oraz eteru koronowego [130]. Etap końcowej zasadowej hydrolizy związków **32**, **33** do monoestrów zachodzi podobnie jak opisano dla odpowiednika etylowego. Metodologię tę zastosowano do otrzymania monoestrów metylowych *N*-benzyloksykarbonylowego fosfonowego analogu leucyny **34** i fenyloglicyny **35** użytych następnie do syntezy, badań aktywności i stabilności fosfonamidowych inhibitorów leucyloaminopeptydazy (rozdz. 3.3 oraz 5.2) [131, 132].

2.2. Synteza estrów alkilowych kwasów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkano-*H*-fosfinowych

Procedura syntezy kwasów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkano-*H*-fosfinowych opracowana przez Baylisa [105] stanowi jedną z najdogodniejszych metod syntezy *N*-blokowanych aminofosfonianów. Wolne aminokwasy uzyskuje się w wyniku addycji kwasu podfosforowego do imin otrzymanych z odpowiedniego aldehydu i difenylometyloaminy (benzhydryloaminy) jako przenośnika grupy aminowej. Wolny aminokwas otrzymuje się po kwaśnej hydrolizie reszty benzhydrylowej. Co znamienne, *N*-protekcja z użyciem chlorowręczanu benzylu przebiega wydajnie w warunkach wodnych. *N*-Acylowane produkty mogą stanowić bezpośrednie substraty do otrzymywania fosfinopeptydów w reakcji typu Michaela, polegającej na przyłączeniu P-H do aktywowanego wiązania podwójnego (patrz rozdz. 4). W przypadkach zastosowania innych metod jest niezbędna dodatkowa

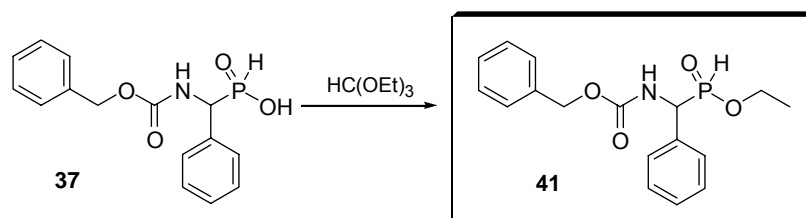


Schemat 3. Procedura syntezy estru benzylowego kwasu
N-benzyloksykarbonylo- α -aminofenylometano-*H*-fosfinowego
(obok zidentyfikowane produkty uboczne reakcji)

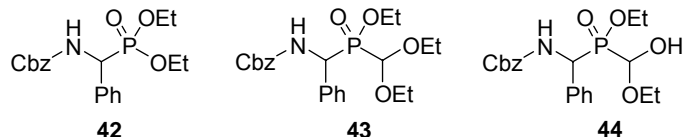
Scheme 3. Synthesis leading to benzyl
N-benzyloxycarbonyl- α -aminophenylmethane-*H*-phosphinate
(and identified by products)

estryfikacja reszty fosfinowej. Warto jednak dodać, że jej reaktywność, a zwłaszcza podatność na utlenienie, powoduje wiele reakcji ubocznych i często prowadzi do otrzymywania mieszanin związków. I tak, produktowi estryfikacji pochodnej fenyloglicyny **37** z użyciem *O*-benzylo-*N,N'*-dicykloheksyloizomocznika w standardowych warunkach towarzyszą zanieczyszczenia odpowiednimi pochodnymi kwasu fosfonowego **39** oraz bisfosfinowego **40** (schemat 3) [124].

Utlenienie ewidentnie towarzyszy estryfikacji, kwas bisfosfinowy **40** natomiast to prawdopodobnie efekt bisamidoalkilowania kwasu podfosforowego na etapie otrzymywania wyjściowego aminokwasu **36**. Rozdział obu produktów ubocznych w celu ich identyfikacji okazał się możliwy za pomocą chromatografii cieczowej, satysfakcjonujące natomiast oczyszczenie docelowego produktu **38** osiągnięto, stosując dodatkową rekrystalizację z acetonu [124].



Produkty uboczne:



Schemat 4. Estryfikacja kwasu *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminofenylometano-*H*-fosfinowego z użyciem ortomrówczanu etylu
Scheme 4. Esterification of *N*-benzyloxycarbonyl- α -aminophenylmethane-*H*-phosphinic acid by means of triethyl orthoformate

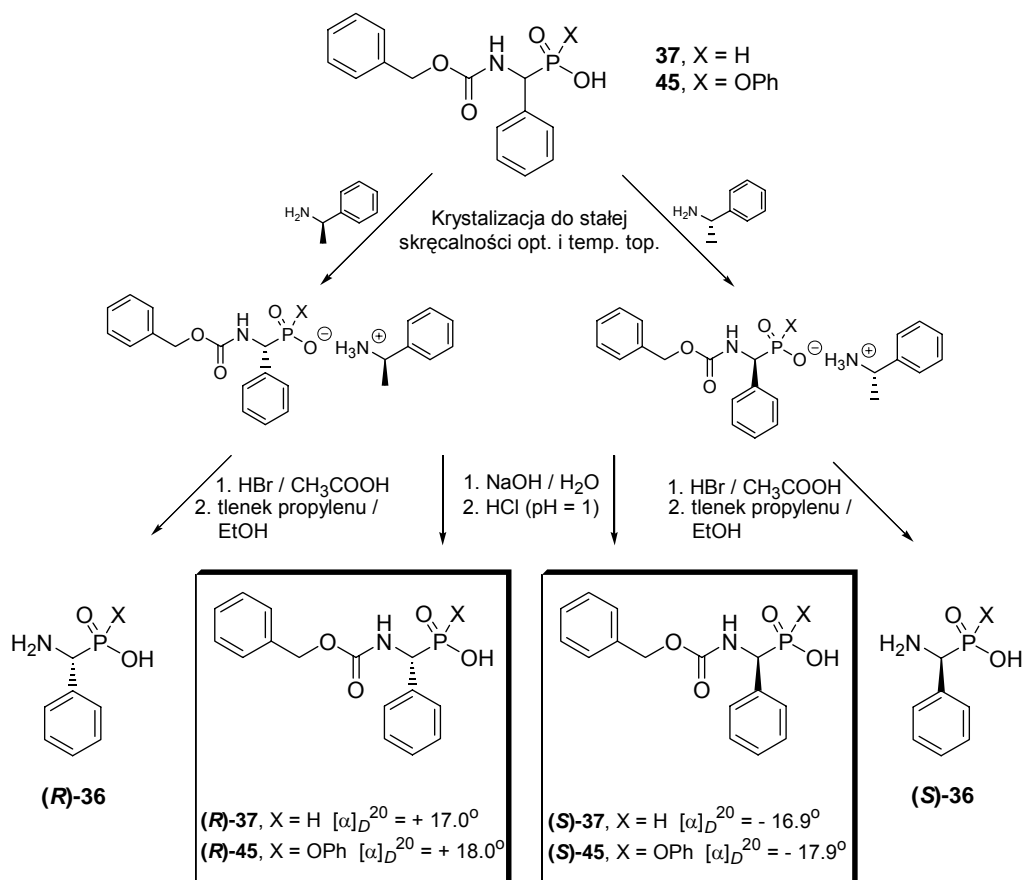
O ile oczyszczony ester benzylowy **38** wydzielono preparatywnie z dobrą wydajnością (70%), o tyle otrzymanie etylowego analogu **41** przez działanie ortomrówczanem trietylu na ten sam substrat **37** okazało się nieefektywne syntetycznie. W tym przypadku otrzymywano bardziej złożoną mieszaninę związków (schemat 4) o składzie silnie zależnym od warunków prowadzenia reakcji (czas, temperatura, obecność katalizatora) [133]. Wyższa temperatura, ogrzewanie do wrzenia, z usuwaniem lub bez usuwania powstającego etanolu, promowała powstawanie w przewodzie produktu utlenienia **42**. Pokojowa temperatura reakcji oraz obecność kwasowego katalizatora np. kwasu *p*-toluenosulfonowego to zoptymalizowane warunki do otrzymywania pochodnej *P*-(dietoksymetylo)fosfinowej **43**

zawierającej chronioną funkcję P–H. To jedyny produkt, dla której osiągnięto na tyle duże przereagowanie (95% wydajności według widma ^{31}P MNR), aby okazało się ono interesujące preparatywnie. Oczekiwanego estru etylowego **41** nie udało się jednak uzyskać z zadowalającą wydajnością w żadnym z zastosowanych wariantów reakcji [133]. Podobnie złożone zachowanie kwasu podfosforowego w obecności ortomrówczanu było przedmiotem studiów Gallaghera i Honeggera [134].

2.3. Rozdział enancjomerów kwasu *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminofenylometano-*H*-fosfinowego oraz odpowiedniego fosfonowego estru monofenyłowego

Syntezyując związki chemiczne o potencjalnych zastosowaniach biologicznych, należy mieć na uwadze, że ich aktywność jest ściśle skorelowana z budową przestrzenną. Także w przypadku zastosowania fosforowych analogów peptydów obserwuje się znaczące różnice w powinowactwie poszczególnych stereoisomerów względem naturalnych receptorów. Znajomość składu diastereoizomerycznego badanej próbki, a najlepiej konfiguracji absolutnej jest zatem niezbędna do jej poprawnej charakterystyki, stanowiąc jednocześnie najpoważniejsze wyzwanie syntetyczne. Centrum chiralności na atomie węgla α w aminofosfonianach jest bardzo mało podatne na racemizację, a optycznie czynne analogi można otrzymać na wiele sposobów, stosując np. enancjoselektywną syntezę asymetryczną [97, 135–137]. Jedną z dogodniejszych metod jest również rozdział diastereoizomerycznych pochodnych (kowalencyjnych lub par jonowych) przez chromatografię lub frakcjonowaną krystalizację. Zaletą metody krystalizacji jest możliwość otrzymania w stosunkowo tani i nieskomplikowany sposób dużych ilości produktów o wysokim stopniu czystości. Dla *N*-blokowanych kwasów α -aminoalkano-*H*-fosfinowych bardzo dobre rezultaty daje zastosowanie enancjomerów α -metylobenzyloaminy [105]. Metoda ta opracowana pierwotnie przez Baylisa i współpracowników została z powodzeniem zastosowana do rozdziału enancjomerów kwasu *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminofenylometano-*H*-fosfinowego **37**, a także estru monofenyłowego kwasu *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminofenylometanofosfonowego **45** (schemat 5) [126, 138].

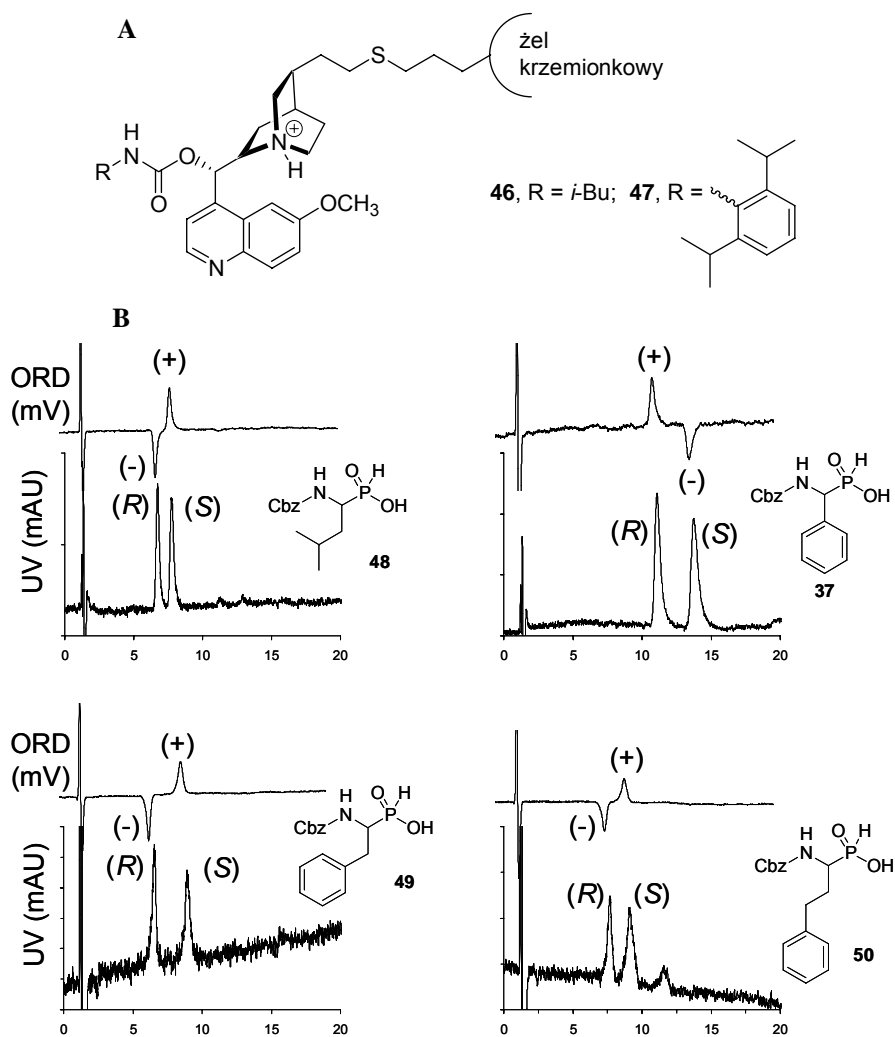
Krystalizacja soli otrzymanych w reakcji z odpowiednimi aminami, prowadzona do uzyskania stałej temperatury topnienia i skręcalności optycznej (możliwa też jest kontrola ^{31}P NMR z dodatkiem selektorów chiralności, patrz rozdz. 2.4) pozwoliła na uzyskanie czystych diastereoizomerycznych produktów. Po ich standardowej przeróbce wydzielono *N*-chronione aminokwasy **37**, **45** o bardzo wysokiej czystości optycznej (nadmiar enancjomeryczny, $ee > 99\%$). W przypadku enancjomerów kwasu α -aminofenylometano-*H*-fosfinowego **36** możliwe było również otrzymanie dobrze zdefiniowanych kryształów w formie monohydratów i rozwiązanie ich struktury krystalicznej, co pozwoliło na oznaczenie ich konfiguracji absolutnej [138].



Schemat 5. Rozdział enancjomerów kwasu *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminofenylometano-*H*-fosfinowego **37** i estru monofenylowego kwasu *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminofenylometanofosfonowego **45** za pomocą enancjomerów α -metylobenzylaminy

Scheme 5. Separation of the enantiomers of *N*-benzyloxycarbonyl- α -aminophenylmethane-*H*-phosphinic acid **37** and monophenyl *N*-benzyloxycarbonyl- α -aminophenylmethanephosphate **45** with use of enantiomers of α -methylbenzylamine

Metoda rozdziału enancjomerów kwasów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkano-*H*-fosfinowych przez krystalizację ich soli z α -metylobenzylaminą okazała się bardzo dogodna i ogólna. Uzyskano w ten sposób między innymi analogi alaniny, leucyny i fenylalaniny o konfiguracji względnej *L* (absolutnej *R*), użyte następnie do syntezy fosfino-peptydów – inhibitorów metaloproteaz (patrz rozdz. 5). W jedynym przypadku, a mianowicie pochodnej homofenylalaniny, kluczowej do syntezy bardzo aktywnych inhibitorów leucyloaminopeptydazy, takiego rozdziału nie udało się osiągnąć. W celu pokonania wymienionej trudności, we współpracy z Zespołem prof. Lindnera (Uniwersytet Wiedeński), zaproponowano wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)



Rys. 6. Struktura jonowymiennej fazy stacjonarnej HPLC modyfikowanej pochodnymi chinidyny **46**, **47** (**A**), użytej do analitycznego rozdzielania kwasów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkano-*H*-fosfinowych (**B**): analogów leucyny **48** i fenyloglicyny **37** (chromatogramy uzyskane z użyciem złoza **46**) oraz fenyloalaniny **49** i homofenyloalaniny **50** (chromatogramy uzyskane z użyciem złoza **47**).

Detekcja UV oraz z pomiarem skręcalności optycznej – ORD

Fig. 6. Chemical structure of the ion-exchange HPLC stationary phase modified by quinidine derivatives **46**, **47** (**A**) to separate analytically *N*-benzyloxycarbonyl- α -aminoalkane-*H*-phosphinic acids (**B**): analogues of leucine **48** and phenylglycine **37** (chromatograms obtained with use of **46**), phenylalanine **49** and homophenylalanine **50** (chromatograms obtained with use of **47**).

UV and optical rotation detection (ORD)

na podłożu chiralnym. W ostatnich latach z sukcesem zastosowano tę technikę używając ziół modyfikowanych alkaloidami chinolinowymi (chinina, chinidyna, cynchonina, cynchonidyna) do enancjoseparacji *N*-podstawionych pochodnych aminokwasów [139, 140]. W badanym przypadku najbardziej efektywne okazały się *O*-karbamoilowe analogi chinidyny **46**, **47** (rys. 6) [141]. Początkowo przeprowadzono serię eksperymentów analitycznych badając rozdział na enancjomery serii kwasów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkano-*H*-fosfinowych **37**, **48-50** (reprezentatywne chromatogramy przedstawiono również na rysunku 6). Dla prawie wszystkich badanych analogów osiągnięte wartości współczynnika rozdziału α (zdefiniowanego jako stosunek względnego czasu retencji $k_{(S)}/k_{(R)}$, patrz także tabela 5) znajdują się w przedziale 1,2–1,3, co oznacza całkowitą separację o różnicy czasu retencji w granicach 2–3 minut.

Detekcja skręcalności optycznej pozwoliła ponadto na stwierdzenie, że wolniej eluowanym enancjomerem jest zawsze ten o konfiguracji absolutnej (*S*), co pozostaje w pełnej zgodności z zaproponowanym modelem oddziaływań chinolinowych selektorów chiralności z *N*-blokowanymi aminokwasami [142, 143]. Przeniesienie skali rozdziału na kolumnę preparatywną dla najbardziej interesującego związku **50** umożliwia otrzymanie obydwu enancjomerów analogu homofenyloalaniny o czystości (*ee*) powyżej 90%.

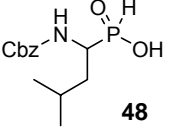
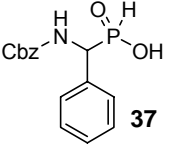
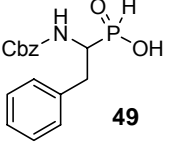
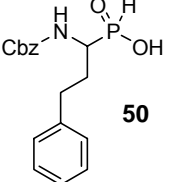
2.4. Analiza składu enancjomerycznego kwasów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkano-*H*-fosfinowych oraz monoestrów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkanofosfonowych

Otrzymywanie produktów o określonej stereochemii jest jednym z podstawowych wyzwań współczesnej syntezy organicznej, ale postęp w tej dziedzinie wymaga zastosowania odpowiednio zaawansowanych technik analitycznych w celu kontroli przebiegu procesów chemicznych, a zatem określenia struktury i czystości otrzymanego produktu. W związku z tym poszukiwane są metody umożliwiające szybką i prostą analizę składu enancjo- i diastereomerycznego. W przypadku analizy składu enancjomerycznego konieczne jest zastosowanie odpowiedniego czynnika dyskryminującego. Ostatnio [144, 145], także w naszym zespole [146–149] zaproponowano użycie niekowalencyjnie wiążących się selektorów chiralności, takich jak: optycznie czynne aminy czy cyklodekstryny do rozdziału i określania udziału enancjomerów związków fosforoorganicznych (przede wszystkim niepodstawionych α -aminofosfonianów), stosując do tego celu techniki chromatograficzne, przede wszystkim HPLC oraz elektroforezę kapilarną (CE), a także spektroskopię ^{31}P NMR. Mechanizm działania takich selektorów polega na tworzeniu się dynamicznych kompleksów diastereoizomerycznych, w tym makrocząsteczkowych układów typu „gość-gospodarz” i różnicowaniu w ten sposób ich właściwości fizykochemicznych.

Wszystkie trzy wymienione techniki z powodzeniem zastosowano do analizy składu enancjomerycznego prekursorów fosforowych analogów peptydów [141, 150–152]. Opracowane warunki oraz otrzymane wyniki rozdziału dla serii kwasów *N*-benzylo-

Tabela 5. Współczynniki enancjodyskryminacji kwasów
N-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkano-*H*-fosfinowych otrzymane technikami
 HPLC, CE oraz NMR z zastosowaniem selektorów chiralności
 (komentarz w tekście)

Table 5. Enantiodiscrimination factors of *N*-benzyloxycarbonyl- α -aminoalkane-*H*-phosphinic acids
 obtained by means of HPLC, CE and NMR techniques with chiral selectors application
 (discussion in the text)

Badany związek	HPLC (α)*		Elektroforeza kapilarna (α)**		³¹ P NMR ($\Delta\delta$ [ppm])***		
	Użyty selektor chiralności						
	46	47	α -CD	β -CD	α -CD	HP- γ -CD	CQD (+ 10 eq. AcOH)
 48	1,19	1,21	1,020	1,021	0,196	0,086	0,159 (0,409)
 37	1,28	1,25	1,040	1,032	0,199	0	0,110 (< 0,02)
 49	1,04	1,46	1	1,008	0,050	0	0,290 (0,197)
 50	1,18	1,23	1,021	1	0,066	0,54	0,237 (0,449)

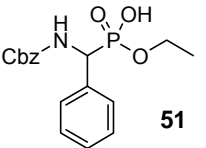
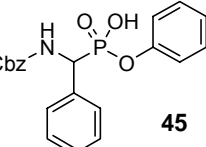
* α – współczynnik rozdzielności zdefiniowany jako stosunek względem czasu retencji enancjomerów: $(t_{(S)}-t_0)/(t_{(R)}-t_0)$, t_0 – czas retencji objętości martwej kolumny (warunki pomiarowe: wymiary kolumny 15 × 4 mm, faza ruchoma: metanol / 50 mM bufor fosforanowy 80:20 v/v, pH 5,6, temperatura 40 °C, przepływ 1 ml/min).

** α – współczynnik rozdzielności zdefiniowany jako stosunek pozornej ruchliwości elektroforetycznej enancjomerów: (warunki pomiarowe: bufor fosforanowy, pH 6,5, stężenie α -cyklodekstryny – 40 mM, stężenie β -cyklodekstryny – 10 mM), 1 – brak rozdzielności.

*** $\Delta\delta$ – różnica przesunięć chemicznych enancjomerów (warunki pomiarów dla cyklodekstryn: D₂O / NaOD, pD ~ 13, stężenie selektora – 100 mM, stężenie selektanda – 10 mM; dla *O*-karbamoilowego analogu chinidyny – CQD: CDCl₃ / DMSO-*d*₆ stężenie selektora – 10 mM, stężenie selektanda – 10 mM), 0 – brak rozdzielności.

ksykarbonylo- α -aminoalkano-*H*-fosfinowych **37**, **48–50** przedstawiono w tabeli 5 (oraz na rys. 6), natomiast dla monoestrów kwasów *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkanofosfonowych **45**, **51** w tabeli 6. Należy podkreślić, że dla wszystkich badanych związków i dla każdej z zastosowanych technik opracowano warunki pozwalające na satysfakcjonujący rozdział enancjomerów.

Tabela 6. Współczynniki enancjodyskryminacji monoestrów kwasu *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminofenylometanofosfonowego otrzymane technikami CE oraz NMR z zastosowaniem cyklodekstryn jako selektorów chiralności
Table 6. Enantiodiscrimination factors of *N*-benzyloxycarbonyl- α -aminophenylmethanephosphonate monoesters obtained by means of CE and NMR techniques with application of cyclodextrins as chiral selectors

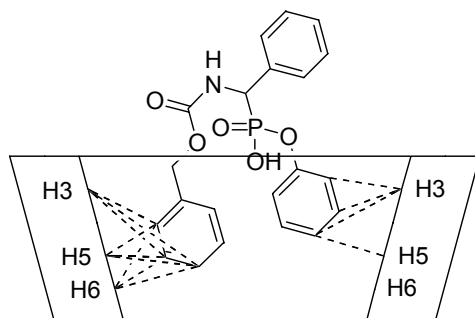
Badany związek	Elektroforeza kapilarna (α)*			³¹ P NMR ($\Delta\delta$ [ppm])**		
	Użyty selektor chiralności					
	α -CD	β -CD	HP- γ -CD	α -CD	β -CD	HP- γ -CD
 51	1,030	1,014	1,014	0,223	0,162	0
 45	1,030	1	1,018	0,184	0,273	0,352

* α – współczynnik rozdziału zdefiniowany jak w tabeli 5 (warunki pomiarowe: bufor fosforanowy, pH 6,0, stężenie α -cyklodekstryny – 40 mM, stężenie β -cyklodekstryny – 5 mM, stężenie hydroksypropylo- γ -cyklodekstryny – 30 mM), 1 – brak rozdziału.

** $\Delta\delta$ – różnica przesunięć chemicznych enancjomerów (warunki pomiarów: D₂O / NaOD, pD ~ 13, stężenie α -CD oraz HP- γ -CD – 100 mM dla stężenia selektanda – 10 mM, stężenie β -CD – 10 mM dla stężenia selektanda – 1 mM), 0 – brak rozdziału.

W przypadku zastosowania cyklodekstryn duży nadmiar selektora silnie sprzyjał zwiększeniu enancjodyskryminacji. Na podstawie danych eksperymentalnych oraz po uwzględnieniu rozpuszczalności poszczególnych oligosacharydów w roztworach analitycznych za optymalne stężenia przyjęto 100 mM dla α -CD oraz HP- γ -CD w technice NMR (oraz odpowiednio 30–40 mM w elektroforezie kapilarnej) wobec 10 mM (5 mM) dla β -CD. Zastosowanie mniejszego stężenia tej ostatniej wynika właśnie z jej słabszej rozpuszczalności w roztworach wodnych. Stężenie substancji analizowanej było przynajmniej dziesięciokrotnie mniejsze. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu pH na współczynniki podziału analizowanych substancji. Zarówno *N*-blokowane kwasy fosfinowe, jak i monoestry fosfonowe to monozasadowe pochodne o stałej pK_a w granicach 0,5–2,0, zatem w prawie całym zakresie pH przeważają ich formy jednakowo zjonizowa-

ne. W technice CE stosowano bufor o pH w granicach 6,0–6,5, natomiast dla potrzeb NMR silnie alkalizowano próbki. W tym drugim przypadku pozwalało to na istotne zwiększenie rozpuszczalności tych wysoce z natury hydrofobowych związków i zmniejszenie w ten sposób czasu analizy. Najbardziej efektywnie dyskryminującą enancjomery okazała się α -cyklodekstryna. Ma to uzasadnienie w ogólnym mechanizmie kompleksowania przez te związki, który polega najczęściej na inkluzji hydrofobowego fragmentu cząsteczki „gościa” w wewnętrznej hydrofobowej wnęce cyklodekstryny, a powstający diastereoizomeryczny kompleks może być dodatkowo stabilizowany poprzez wiązania wodorowe tworzone z grupami hydroksylowymi. W przypadku głównego lipofilowego fragmentu badanych związków, tj. niepodstawionego pierścienia fenyłowego, oddziaływania te są optymalne właśnie dla α -CD. Ze względu na obecność przynajmniej dwóch takich fragmentów w cząsteczce, interakcje mogą dotyczyć zarówno łańcucha bocznego aminofosfonianu, jak i reszty grupy Cbz, czego dowiodły badania kompleksów technikami dwuwymiarowego magnetycznego rezonansu jądrowego. Rezultatem tego jest tworzenie się dwóch różnych kompleksów o stechiometrii 1:1, a także dodatkowego o stechiometrii 1:2 [150]. W przypadku niektórych analogów, np. **45**, znacznie lepszy rozdzielanie uzyskano, stosując γ -cyklodekstryny o dużo „obszerniejszej” wnęce inkluzyjnej. Powodem tego może być jednoczesne kompleksowanie dwóch grup hydrofobowych przez jedną cząsteczkę selektora (rys. 7) [151].

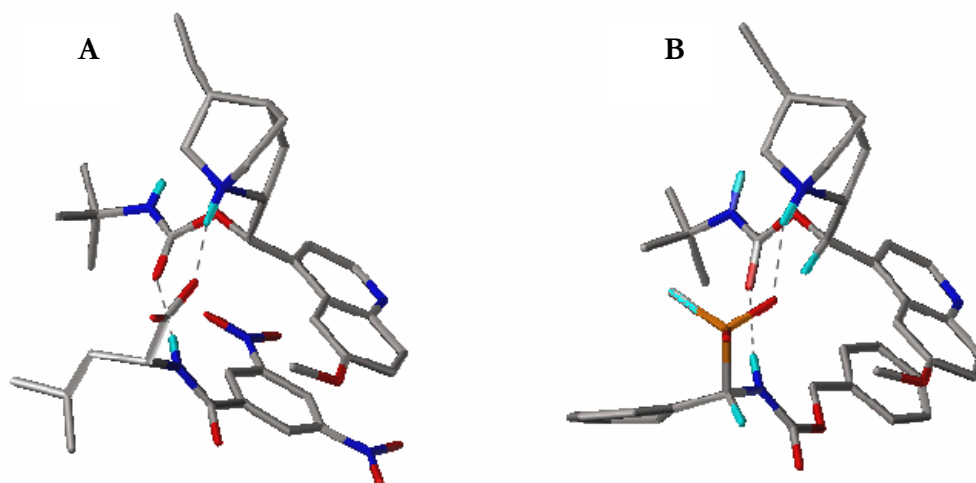


Rys. 7. Schematyczna struktura kompleksu estru monofenyłowego kwasu *N*-benzylotlenofosfonowego **45** i 3-hydroksypropyl- γ -cyklodekstryny (HP- γ -CD) z zaznaczonymi kontaktami pomiędzy protonami dwóch grup fenyłowych „gościa” i selektora na podstawie widma 2D-ROESY

Fig. 7. Schematic structure of the complex of the monophenyl ester of *N*-benzylotlenofosfonowego acid **45** and 3-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin (HP- γ -CD) with contacts between protons of two phenyl groups of the guest molecule and the selector based on the 2D-ROESY spectrum

O-Karbamoilowe pochodne alkaloidów chinolinowych silnie oddziałują z odpowiednimi stereoizomerami *N*-benzylotlenofosfonowymi pochodnych aminofosfonianów w równomolowym stężeniu (ustalonym na wartości 10 mM dla techniki ^{31}P NMR). Zwiększanie nadmiaru selektora nie wykazuje istotnego wpływu na efektywność chiralnej

separacji i nie jest też konieczne, gdyż dobry rozdział sygnałów rezonansowych obserwuje się już przy równomolowej proporcji. Co ciekawe, a jednocześnie trudne do wyjaśnienia, podczas pomiaru prowadzonego w niewodnym rozpuszczalniku (CDCl_3), efekt separacji wzmaga dodatek kwasu np. octowego (patrz tabela 5). Zaproponowany poprzednio [142, 143] mechanizm oddziaływań polega na silnej jonowej interakcji dodatnio naładowanego jonu amoniowego selektora z kwasową grupą fosfonową. Tworzenie pary jonowej jest dodatkowo „wspomagane” przez umiejscawianie się *N*-podstawnika selektanda w hydrofobowej wnęce kształtowanej przez płaski pierścień chinoliny, podstawnik grupy karbamoilowej oraz usztywniony fragment chinuklidyny dyskryminatora, a także dodatkowe wiązanie wodorowe między resztami karbaminianów. Oddziaływania takie są ściśle stereospecyficzne, w wyniku czego analogi (*8S,9R*) alkaloidów chinolinowych (np. pochodne chininy) rozpoznają enancjomer (*S*) aminokwasu karboksylowego zawierającego hydrofobowy *N*-podstawnik, natomiast analogi (*8R,9S*) (np. pochodne chinidyny) wykazują powinowactwo względem enancjomeru (*R*) (rys. 8) [142, 143]. Ze względu na zmianę starszeństwa podstawników (według Cahn, Ingolda i Preloga) dla analogów fosforowych rozpoznawanie chiralne formalnie wykazuje przeciwną zależność od konfiguracji określonej symbolami *R/S* [141]. Jednak przestrzenne ułożenie podstawników stereogenicznego atomu węgla, jak i ogólna konformacja cząsteczki są analogiczne (rys. 8).

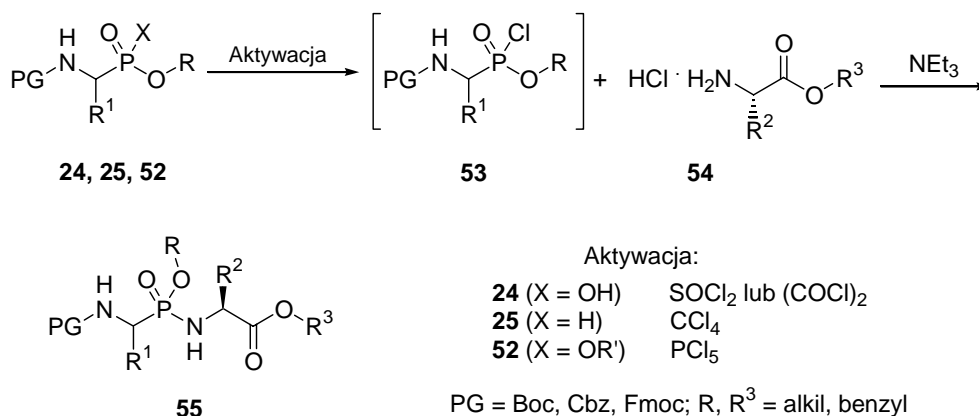


Rys. 8. Porównanie sposobu oddziaływania *N*-podstawionych aminokwasów z *O*-9-(*t*-butylokarbamoilo)chinidyną: uzyskanego na podstawie struktury krystalicznej kompleksu z (*R*)-*N*-3,5-dinitrobenzoyloleucyną (**A**) oraz proponowanego dla enancjomeru (*S*) kwasu *N*-benzyloksykarbonyloaminofenylometano-*H*-fosfinowego **37** (**B**)

Fig. 8. Comparison of interaction modes of *N*-substituted amino acids with *O*-9-(*t*-butylcarbamoyl)quinidine obtained based on the crystal structure of complex with (*R*)-*N*-3,5-dinitrobenzoyl-leucine (**A**) and *N*-benzyloxycarbonyl- α -aminophenylmethane-*H*-phosphinic acid **37** (**B**) suggested for the (*S*) enantiomer

3. Synteza, reaktywność i stabilność fosfonamidowych analogów dipeptydów

Od dwudziestu pięciu lat analogi peptydów zawierające wiązanie fosfonamidowe budzą powszechne zainteresowanie jako mimetyki stanu przejściowego enzymatycznej hydrolizy wiązania amidowego w substratach peptydowych, wykazujące silną aktywność inhibitorową, szczególnie względem metaloproteaz [51, 89, 153]. Pomimo że metody ich syntezy opracowano już wcześniej [154–158], to rozwój tej tematyki w zasadzie nie wykazuje przełomowego postępu, a stosowane procedury – analogiczne do pierwotnie opracowanych – są nadal często zawodne i mało powtarzalne. Problemy te spowodowane są nie tylko obecnością różnych grup funkcyjnych w cząsteczce fosfonamidu i koniecznością ich selektywnego blokowania lub odblokowania, lecz przede wszystkim reakcjami ubocznymi towarzyszącymi tworzeniu wiązania P–N [125, 159–164], a także niestabilnością wymienionego wiązania [51, 53, 158, 165–168].



Schemat 6. Ogólna procedura syntezy fosfonamidowych analogów dipeptydów przez aktywację *N*-podstawionych α -aminoalkanofosfonianów do odpowiednich fosfonochlorków i ich substytucję z użyciem aminoestrów

Scheme 6. General procedure of synthesis of phosphonamidate dipeptide analogues *via* activation of *N*-substituted α -aminophosphonates to obtain the corresponding phosphonochlorides and subsequent substitution with the amino esters

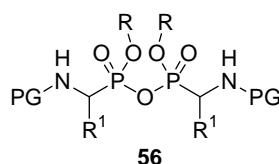
Ogólnie związki fosfonamidowe **55** otrzymuje się w reakcjach substytucji nukleofilowej odpowiednich fosfonochlorków **53** z użyciem aminoestrów **54**, w obecności amin trzeciorzędowych (np. trietyloaminy) w bezwodnych rozpuszczalnikach (schemat 6). *N*-Blokowane monochlorki fosfonowe **53** można natomiast utworzyć na trzy podstawa-

we sposoby: w reakcjach monoestrów fosfonowych **24** z chlorkiem tionylu lub chlorkiem oksalilu [83, 106, 125–128, 161–165, 167, 169–175], diestrów fosfonowych **52** z pięciochlorkiem fosforu [154–157, 161, 166, 168] oraz przez oksydatywne chlorowcowanie estrów fosfinowych **25** [120, 125].

Spośród innych, bardzo specyficznych i mniej wiarygodnych metod otrzymywania peptydów zawierających wiązanie fosfonamidowe można przykładowo wymienić addycję fosfonowego estru siłowego do izonitrylu [176], czy syntezę katalizowaną enzymatycznie [177, 178].

Wracając do podstawowych metod aktywacji do fosfonochlorków i porównując je ze sobą, należy stwierdzić, że zdecydowanie powszechnie jest stosowana transformacja monoestrów fosfonowych **24** z użyciem SOCl_2 lub $(\text{COCl})_2$. Przebiega ona w stosunkowo łagodnych warunkach: reagent użyty jest w ilości stechiometrycznej lub w niewielkim nadmiarze, a aktywacja odbywa się w niskowrzącym rozpuszczalniku organicznym, zwykle w chloroformie lub w chlorku metylenu. Większość stosowanych grup ochronnych, zarówno *N*-karbaminianowych, jak i *P*-estrowych jest stabilna w tych warunkach. Nieco inna sytuacja występuje w reakcji diestrów fosfonowych **52** z PCl_5 . Ta druga procedura, znacznie bardziej drastyczna, jest właściwie ograniczona jedynie do ftalimidowych pochodnych dietylowych lub diizopropylowych. Najłatwiejsze do późniejszego selektywnego usunięcia estry metylowe czy benzylowe oraz karbaminianowe grupy ochronne okazały się być częściowo labilne podczas jej zastosowania [161].

Niestety, użycie chlorku tionylu także nie jest pozbawione niedogodności. W trakcie aktywacji obserwuje się bowiem tworzenie produktów ubocznych zidentyfikowanych jako pirofosfoniany **56** (rys. 9) [164].



Rys. 9. Ogólna struktura pirofosfonianowego produktu ubocznego powstającego podczas aktywacji monoestrów fosfonowych chlorkiem tionylu
 Fig. 9. General structure of pyrophosphonate by-product produced during activation of phosphonate monoesters by means of thionyl chloride

Pirofosfoniany **56** są mniej reaktywne chemiczne niż odpowiednie fosfonochlorki, a co najistotniejsze bierne (lub reagujące bardzo powoli) wobec nukleofili azotowych, zmniejszając w ten sposób całkowitą wydajność procesu. Tworzeniu się pirofosfonianów można częściowo zapobiec, modyfikując warunki reakcji, np. stosując chlorek oksalilu zamiast chlorku tionylu lub prowadząc reakcję w większym rozcieńczeniu. Szczególnie efektywne okazało się użycie $(\text{COCl})_2$ w obecności katalitycznych ilości DMF [174, 179] lub soli srebra [174]. Należy pamiętać, że pomyślne zrealizowanie syntezy zależy od struktury substratów,

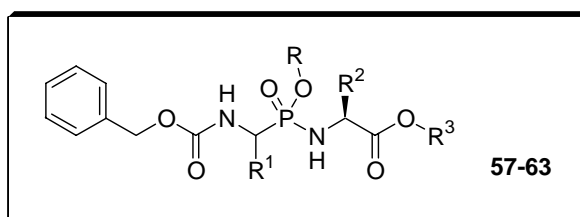
dlatego też praktycznie w każdym przypadku warunki prowadzenia procesu trzeba indywidualnie optymalizować.

Trzecia podstawowa metoda generowania fosfonochlorków znana jest w literaturze jako reakcja Athertona–Todda [180]. Polega ona na oksydacyjnym chlorowcowaniu *N*-blokowanych estrów fosfinowych **25**. Reakcja przebiega zwykle *in situ* w obecności nukleofila oraz aminy trzeciorzędowej w czterochlorku węgla będącym jednocześnie reagentem utleniającym. Ze względu na bardzo duży nadmiar reagenta/rozpuszczalnika powstawanie bezwodników fosfonowych nie stanowi w tym przypadku istotnego problemu, mimo to oksydacyjne chlorowcowanie cieszy się stosunkowo małym zainteresowaniem.

W syntezie pseudopeptydów fosfonamidowych próbowano stosować monoestry *N*-chronionych α -aminofosfonianów i standardowe środki kondensujące oraz sposoby aktywacji, takie jak: karbodiimidy, estry *p*-nitrofenylowe czy pochodne benzotriazolu. Doniesienia na ten temat są jednak sprzeczne. W większości przypadków nie otrzymano oczekiwanych produktów lub obserwowano minimalne ich wydajności (zwykle poniżej 25–30%) [154, 155, 158, 181, 182]. Tylko w pojedynczych pracach opisywane są próby bezpośredniego użycia BOP [183] czy DPPA [165] zakończone umiarkowanym powodzeniem (40–65% wydajności). Udowodniono, że przekształcenie fosfonianów w aktywne estry benzotriazolu może być efektywne, ale wychodząc tylko z odpowiednich fosfonochlorków [174].

Największym problemem w otrzymywaniu i stosowaniu fosfonamidów jest jednak ich labilność, przede wszystkim podatność na hydrolizę, obserwowana po całkowitym, a nawet selektywnym usunięciu grup ochronnych [51, 53, 158, 165–168]. Dotyczy to między innymi *N*-blokowanych analogów dipeptydów, opisywanych jako niezwykle silne inhibitory metaloproteaz. Przykładowo, Bartlett w jednej z pierwszych prac dotyczących tych związków, podaje, że czas półtrwania analogu Cbz–GlyP[NH]Phe–OH wynosi 4 godziny w roztworze wodnym o pH 6,2 [51]. Czas ten znacząco zwiększa się nawet w minimalnie bardziej zasadowym środowisku (7 dni w roztworze o pH = 7), a maleje w bardziej kwaśnym. Doskonałym uzupełnieniem tej charakterystyki są badania krystalograficzne Christiansona i Lipscomba nad kompleksem karboksypeptydazy A z tym samym związkiem (Cbz–GlyP[NH]Phe–OH) [60, 184]. Zależnie od zastosowanego pH (8,5 lub 7,5) autorzy otrzymali krystaliczne kompleksy enzymu z dipeptydem fosfonamidowym lub powstałym w wyniku jego hydrolizy kwasem *N*-benzyloksykarbonylo-1-amino-2-fenylloetanofosfonowym.

Za zupełnie niewiarygodne należy uznać natomiast doniesienia literaturowe opisujące otrzymanie i zastosowanie całkowicie odblokowanych analogów fosfonamidowych [128, 185]. Staje się to oczywiście zwłaszcza w świetle przedstawionych wyników badań własnych autora dotyczących syntezy, chemicznej reaktywności, a przede wszystkim właśnie stabilności tych związków. Labilność hydrolityczna tej grupy pseudopeptydów została bowiem po raz pierwszy ściśle skorelowana z obecnością grup ochronnych w cząsteczce oraz z pH roztworu.



Substrat (aminofosfonian)	Nukleofil*	Produkt**	Metoda	Wyd. [%]	³¹ P NMR: δ [ppm] (skład izom.)
29 (X = OH, R ¹ = Ph, R = Bzl)	HCl × H-Gly-OMe	57	A	73	26,0; 26,5 (1:1)
38 (X = H, R ¹ = Ph, R = Bzl)	HCl × H-Gly-OMe	57	B	65	26,6; 27,1 (1:1)
	HCl × H-Ala-OMe	58	B	48	25,6; 25,9; 26,2 (2:4:1)
	HCl × H-Val-OMe	59	B	43	26,2; 26,3; 26,9 (2:3:5)
	HCl × H-Val-OMe	(R,S)-59	B	45	26,3; 26,9 (3:2)
(S)-38	HCl × H-Val-OMe	(S,S)-59	B	45	26,2; 26,9 (2:3)
45 (X = OH, R ¹ = Ph, R = Ph)	HCl × H-Val-OMe	60	A	48	23,47; 24,00; 24,32 (2:3:2)
	BzlNH ₂	61	A	61	24,55; 24,78 (3:2)
	BzlNH ₂	(R)-61	A	65	24,55; 24,78 (1:3)
	BzlNH ₂	(S)-61	A	65	24,55; 24,78 (1:3)
34 (X = OH, R ¹ = <i>i</i> -Bu, R = Me)	HCl × H-Gly-OMe	62	A	55	31,39; 32,72 (2:3)
	HCl × H-Leu-OMe	63	A	52	30,45; 30,96; 31,90; 32,23 (4:4:3:2)

* Poza aminoestrami (zawsze o konfiguracji absolutnej (*S*)) stosowano także inne nukleofile aminowe.

** Konfiguracje absolutne odnoszą się do atomów węgla α (dokładniejsze komentarze w tekście).

Schemat 7. Ogólna procedura syntezy związków fosfonamidowych, głównie analogów dipeptydów, oraz charakterystyka otrzymanych reprezentatywnych struktur

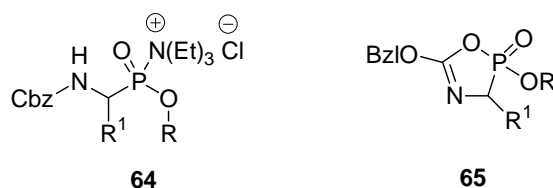
Scheme 7. General procedure of synthesis of phosphonamidate compounds, mainly dipeptide analogues, and characterisation of the representative structures obtained

3.1. Badania dotyczące syntezy związków fosfonamidowych

Jak zaznaczono we wstępie do niniejszego rozdziału, wydajna synteza związków zawierających wiązanie fosfonamidowe wciąż stanowi wyzwanie. Ogólnie stosowaną metodą z wyboru, ale na pewno niedoskonalą i obciążoną trudnymi do wyeliminowania niedogodnościami, pozostaje aminoliza *N*-blokowanych α -aminofosfonianów aktywowanych do odpowiednich fosfonochlorków. Na schemacie 7 przedstawiono reprezentatywne struktury fosfonamidów otrzymanych za pomocą tej procedury [125, 126, 131].

Wydajność izolowanych związków mieści się w granicach 45–70% i była zgodna z doniesieniami literaturowymi. Większe wydajności, mieszczące się w granicach 55–70%, obserwowano zwykle dla mniej sterycznie przeszkodzonych nukleofili (H–Gly–OMe, BzLNH₂), natomiast dla aminoestrów z rozbudowanym łańcuchem bocznym (H–Val–OMe, H–Leu–OMe) na ogół nie przekraczały 50%. Niemniej jednak, należy stwierdzić, że nie prowadzono systematycznych badań zmierzających do udokumentowania takiej zależności. Analiza spektroskopowa dokonywana na różnych etapach syntezy wykazała, że efektywność procesu jest zaniżana w wyniku tworzenia się pirofosfonianów o wzorze ogólnym **56** przedstawionym na rysunku 9. Przykładowo dla aktywacji monoestru metylowego *N*-benzyloksykarbonylowego analogu leucyny **34** za pomocą SOCl₂ oznaczało to obecność złożonego multipletu o przesunięciu chemicznym 17,7 ppm. Stanowił on około 30% składu mieszaniny i był głównym produktem ubocznym wobec powstającego fosfonochlorku (³¹P NMR: δ 42,8 oraz 43,7 ppm, 1:1) [131]. Multipletowość sygnału zanieczyszczenia jest spowodowana jego złożonym składem stereoizomerycznym.

Dodanie nukleofila w obecności trietyloaminy powoduje natychmiastowe zanikanie sygnałów pochodzących od fosfonochlorku. Jeśli chodzi o pirofosfonian, to również może on wolno reagować z aminą (aminoestrem), dając oczekiwany produkt – fosfonamid oraz odtwarzając cząsteczkę substratu [131, 164]. Dlatego też reakcję prowadzono zwykle do zaniku pirofosfonianu, kontrolując jej przebieg za pomocą ³¹P NMR [125, 126, 131].



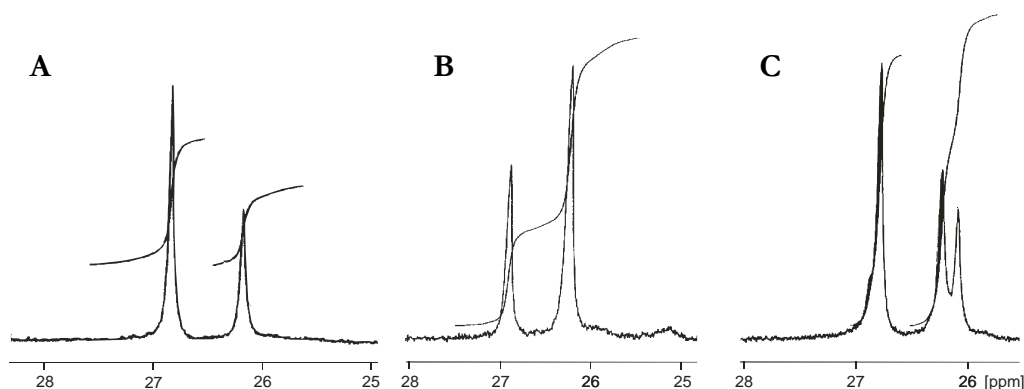
Rys. 10. Proponowane struktury produktów pośrednich syntezy wiązania fosfonamidowego powstających podczas dodania trietyloaminy do fosfonochlorku otrzymanego z *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkanofosfonianu monoalkilowego

Fig. 10. Suggested structures of intermediates of synthesis of the phosphonamidate bond formed while adding triethylamine to phosphonochloridate obtained from monoalkyl *N*-benzyloxycarbonyl- α -aminoalkanephosphonate

Postuluje się, że dodanie trzeciorzędowej aminy do fosfonochlorku przed lub równocześnie z dodaniem nukleofila powoduje tworzenie się bardzo reaktywnego produktu pośredniego reakcji obserwowanego na widmie ^{31}P NMR – soli fosfonoamoniowej **64** (rys. 10) [125, 163, 164] lub proponowanego alternatywnie tlenku oksoazafosfolidynowego **65** powstającego w wyniku cyklizacji fosfonochlorku z udziałem reszty karbaminianowej [186].

Drugim czynnikiem mogącym powodować zmniejszenie całkowitej wydajności procesu jest obecność wody, powodującej hydrolizę reaktywnych produktów pośrednich. Dlatego też reakcja wymaga przestrzegania ściśle restrykcyjnych warunków – zarówno rozpuszczalniki, jak i reagenty muszą być absolutnie bezwodne (i bezalkoholowe w przypadku chlorowcopochodnych stabilizowanych dodatkiem alkoholu).

Porównanie za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR przebiegu aktywacji monoestrów fosfonowych chlorkiem tionyłu względem oksydacyjnego procesu chlorowcowania czterochlorkiem węgla estrów fosfinowych nie przemawia w jednoznaczny sposób na korzyść żadnej z metod. Osiągane wydajności są zbliżone (patrz związek **57**, schemat 7), a warunki prowadzenia reakcji podobne [125]. Jednak jednoetapowe i prowadzone w jednym naczyniu utlenianie Athertona–Todd’a wydaje się być mniej podatne na wpływ czynników zewnętrznych. Mimo tych zalet nie znalazło ono powszechnego zastosowania w syntezie peptydów fosfonamidowych.

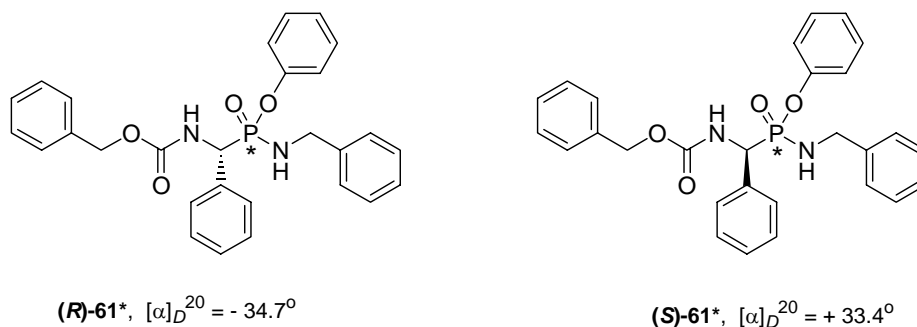


Rys. 11. Porównanie widm ^{31}P NMR dipeptydów **(S,S)-59** (A) oraz **(R,S)-59** (B) o zdefiniowanych konfiguracjach na stereogenicznych atomach węgla α otrzymanych z enancjomerów **(R)-38** i **(S)-38** względem analogu **59** (C) otrzymanego z użyciem racematu **38**

Fig. 11. Comparison of ^{31}P NMR spectra of dipeptides **(S,S)-59** (A) and **(R,S)-59** (B) of defined configurations of the stereogenic α carbon atoms, obtained from the enantiomers **(R)-38** and **(S)-38**, to analogue **59** (C) obtained from the racemic mixture **38**

Zarówno powstające w wyniku aktywacji fosfonochlorki, jak i końcowe fosfonamidowe produkty substytucji nukleofilowej zawierają asymetryczny atom fosforu. W najprostszym przypadku, tj. gdy zastosowanym aminokwasem jest glicyna lub amina, która nie zawiera asymetrycznego atomu węgla np. benzyloamina, powstające produkty są mieszaniną racemicznych diastereoizomerów $R^C R^P$, $S^C S^P$ oraz $R^C S^P$, $S^C R^P$ (odpowiednio, konfi-

guracja atomu węgla α aminofosfonianu oraz konfiguracja stereogenego atomu fosforu), np.: **57**, **61** oraz **62**. Gdy użyty nukleofil jest pochodną naturalnego aminokwasu o zdefiniowanej konfiguracji absolutnej (*S*), mieszanina poreakcyjna składa się z czterech diastereoizomerów ($R^C R^P S^C$, $S^C S^P S^C$, $R^C S^P S^C$, oraz $S^C R^P S^C$): **58**, **59**, **60** oraz **63**. Wszystkie stereoizomery są obecne w wydzielanym produkcie i poza przypadkową izochronią jest to dobrze widoczne na widmach ^1H oraz ^{31}P NMR (schemat 7). Przykład ewidentnego nakładania się sygnałów pokazuje zastosowanie optycznie czystych substratów **38** do otrzymywania analogu dipeptydu **59** (rys. 11). Zsumowanie widm ^{31}P NMR produktów (***R,S***-**59** oraz (***S,S***-**59** (każdy z nich jest mieszaniną dwóch diastereoizomerów o zdefiniowanych konfiguracjach na atomach węgla α i niezdefiniowanej na atomie fosforu, co daje dwa wyraźnie oddzielone sygnały rezonansowe) otrzymanych z enancjomerów (***R***-**38** i (***S***-**38** daje dokładny obraz produktu syntezy z użyciem racematu **38**. Nakładanie pasm absorpcji jest oczywiste, a integracja bardzo dokładnie zsumowana.



Rys. 12. Diastereoizomery *N*-[*N*'-benzyloksykarbonylo- α -aminofenylometano(fenoksy)-fosfinylo]benzyloaminy ze zdefiniowanym centrum stereogenym na atomie fosforu
 Fig. 12. Diastereoisomers of *N*-[*N*'-benzyloxycarbonyl- α -aminophenylmethane(phenoxy)-phosphinyl]benzylamine with the defined stereogenic centre on the phosphorus atom

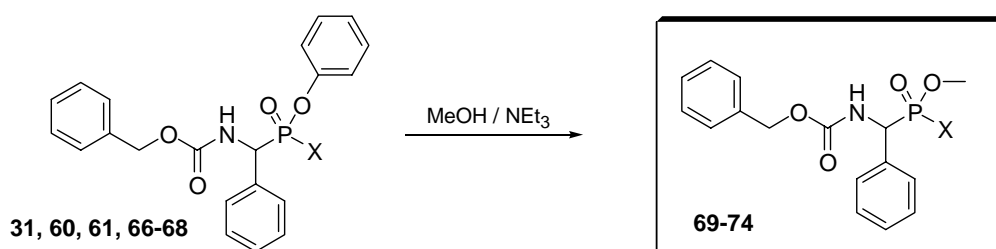
Zastosowanie enancjomerycznie czystych substratów **38**, **45**, których otrzymywanie opisano w rozdziale 2.3, daje szansę łatwej oceny stereoselektywności i stereospecyficzności reakcji substytucji fosfonochlorków, ponieważ integracja sygnałów w produkcie dokładnie odpowiada udziałowi poszczególnych izomerów (patrz schemat 7 oraz rysunek 11). Brak tu jednak spektakularnych obserwacji. Nowo powstające centrum asymetrii na atomie fosforu fosfonochlorku tworzy się praktycznie bez indukcji, nadmiar natomiast diastereomeryczny (*de*) w przypadku fosfonamidów osiąga najwyżej 20–25%. Jednak zmiana rozpuszczalnika ze zwykle stosowanego chloroformu (lub chlorku metylenu) na benzen pozwoliła na otrzymanie mieszanin diastereomerycznych (***R***-**61** oraz (***S***-**61** o odwróconej charakterystyce i znacznie bardziej zaburzonych proporcjach (25:75). Co więcej, kilkukrotne powtórzenie krystalizacji z octanu etylu zaowocowało wydzieleniem czystych diastereoizomerów o zdefiniowanej konfiguracji również na atomie fosforu (***R***-**61*** oraz (***S***-**61*** (rys. 12) [126]. Pojedyncze, opisane w literaturze przykłady osiągnięcia takiego efektu

zostały podane przez Bartletta dla fosfonamidu Cbz-PheP[O(OPh)NH]-(*S*)-Ala-OMe [169] oraz przez Campa i współpracowników dla znacznie bardziej rozbudowanego tetrapeptydu: Boc-(*S*)-Asn-PheP[O(OMe)NH]Pro-(*S*)-Ile-NH-*i*-Bu [172] z zastosowaniem rozdzielania techniką HPLC.

Próby otrzymania odpowiednich monokryształów do badań rentgenowskich nie powiodły się. Konfiguracja absolutna atomu fosforu pozostała więc nieznaną, ponieważ nie udało się tego również ustalić z zastosowaniem eksperymentów dwuwymiarowego NMR. Niemniej jednak otrzymane związki posłużyły do badania przebiegu i stereochemii transestryfikacji estrów fenylowych [126] (patrz następny rozdział).

3.2. Transestryfikacja fosfonamidów *O*-fenylowych jako chemiczny model inhibicji proteaz serynowych

Interesującą reaktywność fosfonamidowych estrów fenylowych względem alkoholi zaobserwowano w zasadowym pH. Dodatek zasady organicznej np. trzeciorzędowej aminy katalizował wymianę reszty -OPh na resztę alkoksylową (schemat 8) [126].



Substrat	Produkt	Wydajność [%]*
60 (X = Val-OMe)	69	75
61 (X = NHBzl)	70	90
66 (X = NHCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂)	71	20
67 (X = NHPH)	72	25
31 (X = OPh)	73	20
68 (X = OBzl)	74	5

* Stopień przereagowania mierzony za pomocą ³¹P NMR po 3 dniach mieszania w temperaturze pokojowej

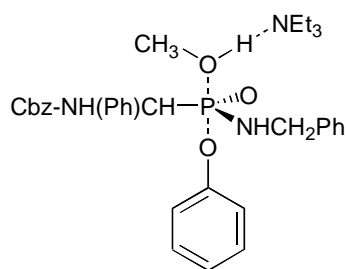
Schemat 8. Transestryfikacja fosfonamidów *O*-fenylowych w zasadowych warunkach oraz porównanie ich reaktywności do difenylfosfonianów oraz mieszanych estrów

Scheme 8. Transesterification of *O*-phenyl phosphonamidates in basic medium and comparison of their reactivity to the reactivities of diphenyl phosphonates and mixed esters

Produktami reakcji były odpowiednie estry metylowe **69–74** oraz fenol. Stopień przereagowania istotnie zależał od podstawnika X. Zdecydowanie największe wydajności osiągnię-

to dla fosfonamidowej pochodnej benzyloaminy **61** oraz dla dipeptydu **60**. Związki z podstawnikami *N*-alkilowym **66** oraz *N*-fenylovym **67** reagowały z mniejszą szybkością, zbliżoną do diestru fenyloвого **31**. Wyniki te przeczą przewidywanemu spadkowi elektrofilowości fosfonamidów w stosunku do difenylofosfonianów [187]. Ta ostatnia grupa związków to modelowy przykład inhibitorów proteaz serynowych ulegających transestryfikacji w centrum aktywnym enzymu. Wynikiem tej reakcji jest fosforylowanie reszty hydroksylowej katalitycznej seryny i nieodwracalne zablokowanie w ten sposób aktywności enzymu. Fakt ten spowodował intensywny rozwój chemii difenylofosfonianów, pochodnych aminokwasów oraz krótkich peptydów, jako dezaktywatorów tej grupy enzymów [187–189]. *O*-Fenylowe pseudopeptydy fosfonamidowe mogłyby okazać się więc bardzo interesującymi analogami, dodatkowo oferującymi możliwość rozbudowy *C*-końca związku. Jak dotychczas temat ten nie był eksplorowany w literaturze i istnieje tylko jedno doniesienie dotyczące tego typu związków jako inhibitorów chymotrypsyny [169].

Kontynuując badania nad transestryfikacją, przetestowano również zastosowanie fluororku potasu, bardzo efektywnego katalizatora transestryfikacji estrów difenyloowych [126]. Również dla fosfonamidowych pochodnych *O*-fenyloowych osiągnięto ilościowe (> 95%) ich przekształcenie w odpowiednie amidoestry metylowe, używając nadmiaru alkoholu w obecności KF oraz eteru 18-korona-6 [130]. W reakcji tej, biegnącej przez fluorofosfoniany obserwowano całkowitą racemizację na atomie fosforu. Niezależnie od składu diastereomerycznego substratu, zawsze otrzymywano produkty w postaci mieszaniny diastereoizomerów o składzie 1:1. Pod tym względem przebieg reakcji różni się zasadniczo od transestryfikacji w warunkach zasadowych, gdzie skład produktów ściśle odpowiadał stereoizomerycznym proporcjom substratów (z odwróceniem kolejności sygnałów ³¹P NMR). Mechanizm tego drugiego procesu to najprawdopodobniej typowa substytucja nukleofilowa na atomie fosforu typu S_N2(P) zachodząca z inwersją konfiguracji (rys. 13).



Rys. 13. Struktura proponowanego stanu przejściowego reakcji transestryfikacji fosfonamidów *O*-fenyloowych w środowisku zasadowym

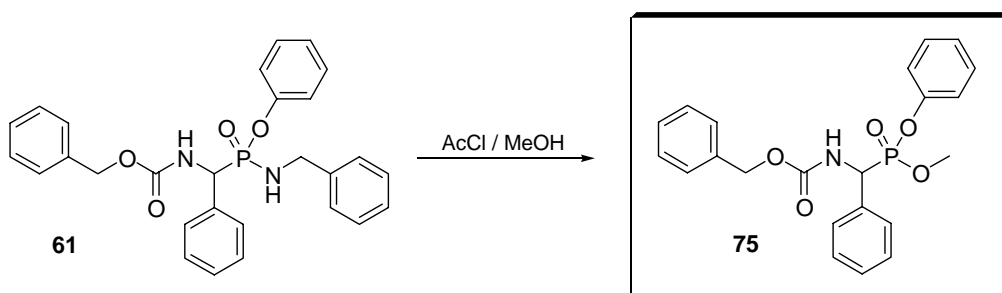
Fig. 13. Structure of the suggested transition state of transesterification of *O*-phenyl phosphonamidates in alkaline medium

Przeprowadzenie reakcji na diastereomerycznie czystych substratach o zdefiniowanej konfiguracji również na stereogennym atomie fosforu (***R***-**61*** oraz ***S***-**61***) potwierdziły te przypuszczenia. Otrzymywano praktycznie tylko jeden diastereoizomer produktu.

Stereoselektywność transestryfikacji przekraczała 95%, a w przypadku (**R**)-**61*** *de* wyniósł nawet powyżej 99%. Obserwacja ta może nie mieć jednak dużego znaczenia praktycznego jeśli chodzi o inhibicję proteaz serynowych, ponieważ ustalone centrum stereogenne na atomie fosforu nie ma decydującego wpływu na reaktywność względem nukleofilowej reszty seryny w centrum aktywnym. Jak ustalono, dla transestryfikacji mieszanych estrów – *P*-fenoksylowych fosfonodepsipeptydów, reaktywność inhibitorów mało istotnie zależy od konfiguracji absolutnej atomu fosforu. Niezależnie od użytego diastereoizomeru końcowy kompleks enzym–inhibitor wykazywał zawsze taką samą stereochemię. Proces przebiega zatem z całkowitą inwersją lub retencją konfiguracji, a w centrum aktywnym może następować proces pseudorotacji [190, 191].

3.3. Badania stabilności wiązania fosfonamidowego

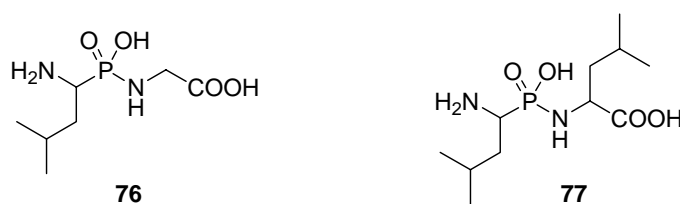
Całkowicie chronione związki fosfonamidowe, a więc zawierające estryfikowane funkcje karboksylową i fosfonamidową oraz acylowaną resztę aminową **57–63**, **69–72**, są stabilne chemicznie [125, 126, 131, 132]. W warunkach pH obojętnego nie ulegają ani hydrolizie, ani alkoholizacji. pH nawet poniżej 1 także nie powoduje wyraźnego zmniejszenia ich trwałości, która może być porównana do trwałości karbaminianu Cbz–NH–obecnego w cząsteczce. Dopiero zastosowanie nieco bardziej drastycznych warunków, takich jak: ogrzewanie w roztworze o pH poniżej 1, działanie roztworem gazowego HCl lub HBr w rozpuszczalniku organicznym, powoduje rozpad wiązania P–N. Dobrze obrazuje to reakcja gazowego chlorowodoru generowanego przez wkraplanie chlorku acetylu do metanolewego roztworu fosfonamidu **61** (schemat 9) [126]. W tych warunkach powstaje mieszanina produktów, z których podstawowym jest mieszany diester **75** będący wynikiem metanolizy wiązania P–N. Głównym produktem ubocznym jest natomiast analogiczny związek pozbawiony grupy Cbz.



Schemat 9. Metanoliza fosfonamidu **61** indukowana gazowym HCl tworzącym się dzięki dodaniu chlorku acetylu do metanolu
Scheme 9. Methanolysis of phosphonamidate **61** induced by HCl generated by addition of acetyl chloride to methanol

Doniesienia literaturowe dotyczące trwałości wiązania fosfonamidowego, w częściowo lub całkowicie odblokowanych analogach dipeptydów, są sprzeczne i mało konsekwentne. Z jednej strony powszechnie stosuje się tego typu związki (przeważnie *N*-benzyloksykarbonylowe pochodne) jako aktywne inhibitory metaloproteaz, z drugiej strony jednak autorzy często mają problemy z ich niekorzystną hydrolizą. Te ewidentne niespójności dały impuls do podjęcia systematycznych badań dotyczących tego zagadnienia,

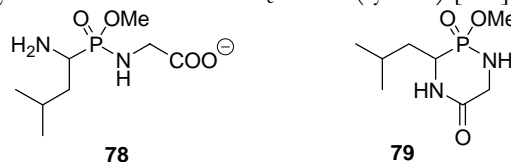
a przede wszystkim powiązania labilności ugrupowania P–N z odczynem roztworu oraz z ochroną lub brakiem ochrony grup funkcyjnych obecnych w cząsteczce. Należy podkreślić, że zdecydowanie brak jest w literaturze takich systematycznych studiów, a uwagi czynione przez autorów mają zwykle charakter pojedynczych, nieuogólnionych obserwacji. W świetle badań prowadzonych w naszym Zespole znalezienie takich zależności było szczególnie istotnie. Komputerowo wspomaganie projektowanie inhibitorów leucyloaminopeptydazy (LAP) zaowocowało bardzo obiecującymi strukturami fosfonamidowych analogów dipeptydów. Kluczowym problemem stało się więc ich otrzymanie oraz przetestowanie odporności na hydrolizę pod kątem możliwości ich praktycznego zastosowania, szczególnie związków z odblokowaną terminalną grupą aminową **76**, **77** (rys. 14). Obecność takiej grupy ma podstawowe znaczenie dla korzystnych oddziaływań inhibitora z kationem cynku obecnym w centrum aktywnym LAP, a zatem generalnie dla inhibicji aminopeptydaz.



Rys. 14. Zaprojektowane fosfonamidowe analogi dipeptydów jako potencjalne inhibitory leucyloaminopeptydazy
Fig. 14. Designed phosphonamidate dipeptide analogues as potential inhibitors of leucine aminopeptidase

Całkowicie chronione prekursorzy tych związków **62**, **63** otrzymano standardowymi metodami (schemat 7) [131]. Selektywne usunięcie reszty benzyloksykarbonylowej nastąpiło poprzez katalityczną hydrogenolizę z użyciem 10% Pd/C jako katalizatora. Ilościowo otrzymane fosfonamidowe diestry H–LeuP[(OMe)NH]Gly–OMe oraz H–LeuP[(OMe)NH]Leu–OMe wykazują zadowalającą stabilność w kwaśnym pH, podobną do *N*-blokowanych analogów. Co oczywiste, w zasadowych wodno-metanolowych roztworach następuje hydroliza estrów podczas gdy wiązanie fosfonamidowe pozostaje nienaruszone. W słabo zasadowych warunkach (pH = 7–9) dla analogu leucyloglicyny

zaobserwowano natomiast selektywną hydrolizę estru karboksylowego dającą związek **78** oraz cyklizację dipeptydu z utworzeniem związku **79** (rys. 15) [132].



Rys. 15. Produkty działania wodno-alkoholowym roztworem o pH = 8,5 na fosfonamid zawierający wolną grupę aminową: H–LeuP[(OMe)NH]Gly–OMe
Fig. 15. Products of action of aqueous-alcoholic solution of pH = 8.5 on the phosphonamidate containing free amino group: H–LeuP[(OMe)NH]Gly–OMe

Tworzenie fosfonamidowego analogu diketopiperazyny **79** jest ograniczone tylko do tego wąskiego zakresu pH, zastosowanie silnie zasadowych warunków prowadzi natomiast do całkowitej hydrolizy obu ugrupowań estrowych. Otrzymywanie podobnych cyklicznych analogów zostało opisane przez Chena i Dana [182, 192]. Ich syntezę przeprowadzili oni w bezwodnych, słabo zasadowych warunkach (dodatek aminy trzeciorzędowej) oraz podwyższonej temperaturze lub wydłużając czas prowadzenia reakcji.

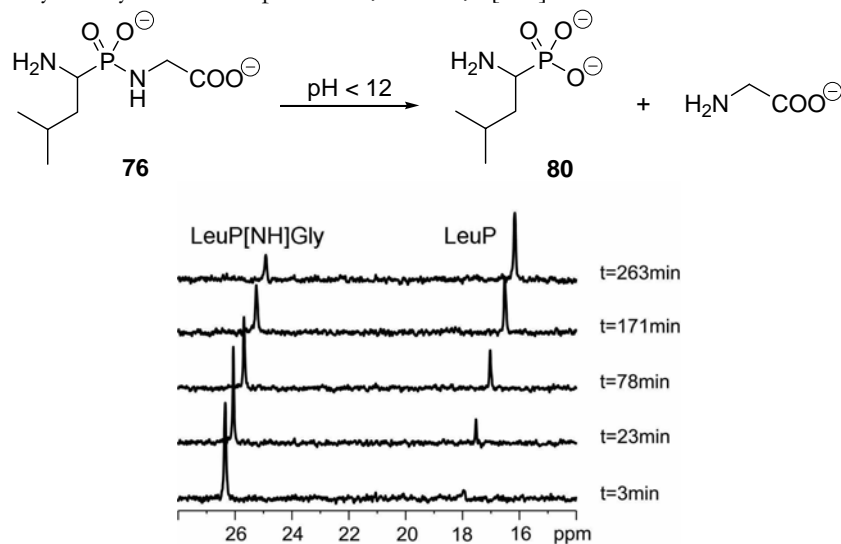
Selektywna hydroliza ugrupowań estrowych (1,5 M LiOH / MeOH) w związkach **62** i **63** dała *N*-benzyloksykarbonylowe analogi – najszerzej studiowane w literaturze fosfonamidowe inhibitory metaloproteaz. Zgodnie z informacjami zamieszczonymi w większości prac, Cbz–LeuP[NH]Gly–OH wykazywał całkowitą odporność na hydrolizę przy pH = 8,5 (7 dni, temperatura pokojowa), a ulegał powolnemu rozpadowi dopiero po zmniejszeniu odczynu roztworu do pH = 7,0 [131, 132]. Odczyn obojętny jest zatem wartością graniczną trwałości takich związków.

Zaskakująco nietrwale okazały się natomiast całkowicie wolne analogi H–LeuP[NH]Gly–OH **76** oraz H–LeuP[NH]Leu–OH **77**. Tylko mocno zasadowym warunkom hydrolizy estrów kończącym procedurę odblokowania grup funkcyjnych należy zawdzięczać to, że mogły być one zarejestrowane i scharakteryzowane spektroskopowo. Już w roztworze o pH poniżej 12 obserwuje się bowiem powolny rozpad tych związków, a przy pH = 10 okres półtrwania analogu **76** wynosi mniej niż 10 min. Produktami hydrolizy wiązania fosfonamidowego w dipeptydzie **76** są odpowiednio fosfonowy analog leucyny **80** oraz glicyna (schemat 10) [131, 132]. Postęp reakcji można łatwo śledzić z zastosowaniem spektroskopii ³¹P NMR wykonując pomiary w określonych odstępach czasu. Integracja sygnałów bardzo dobrze obrazuje zanikanie fosfonamidu ($\delta \sim 26$ ppm) i powstawanie kwasu α -aminoalkanofosfonowego **80** ($\delta \sim 17$ ppm) [132].

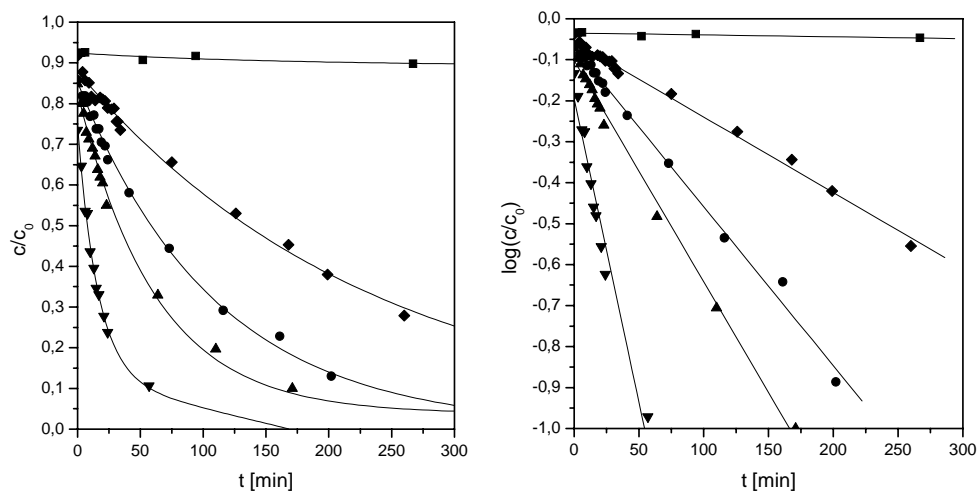
Za minimalne przesunięcie sygnałów ku wyższym polom odpowiedzialne jest nieznaczne zmniejszenie pH obserwowane podczas degradacji, o ile proces nie jest buforowany. Ta zmiana pH spowodowana jest różnicami w pK_a powstających grup kwasowych oraz zasadowych, a co istotniejsze ma również autokatalityczny wpływ na postęp reakcji.

W przypadku analogu leucyloleucyny **77** mamy do czynienia z dwoma diastereoizomerami (*R,S*) oraz (*S,S*), co daje dwa dobrze rozdzielone sygnały w widmie ³¹P NMR. Ich

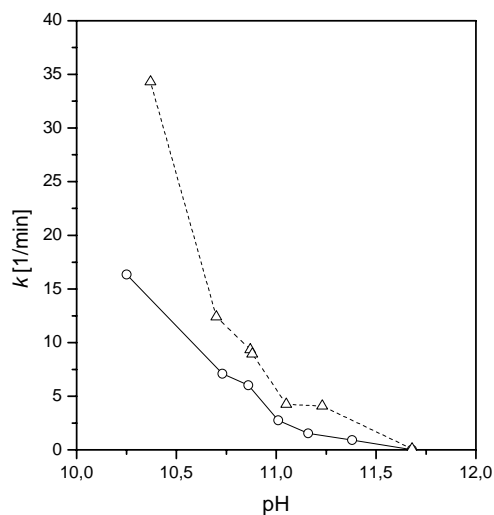
zachowanie mogło być monitorowane niezależnie, ale nie zaobserwowano różnic w szybkości ich hydrolizy w zakresie pH od 10,0 do 12,0 [132].



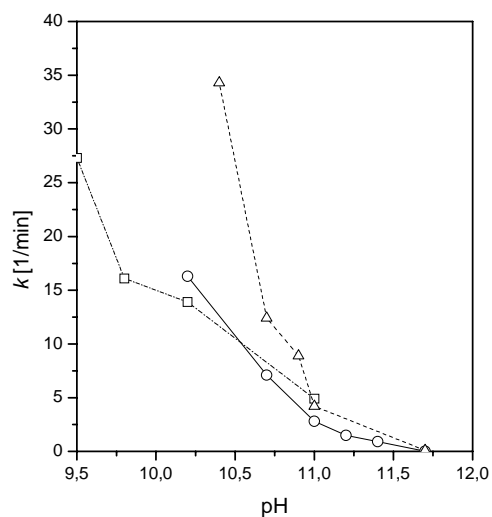
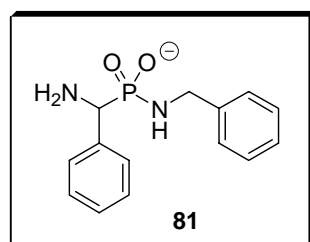
Schemat 10. Hydroliza wiązania fosfonamidowego w analogu leucylglicyny (schemat reakcji),
postęp hydrolizy dla pH = 11 monitorowany za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR
Scheme 10. Hydrolysis of the phosphoramidate bond in leucylglycine analogue: scheme of the reaction
and hydrolysis progress at pH = 11 monitored by means of ^{31}P NMR spectroscopy



Rys. 16. Stopień hydrolizy aminofosfonianu H-LeuP[NH]Gly-OH **76** przedstawiony jako liniowy i logarytmiczny spadek stężenia substratu w czasie, przy różnych, ustalonych początkowo wartościach pH (■ – pH = 11,7, ◆ – pH = 11,1, ● – pH = 10,9, ▲ – pH = 10,7, ▼ – pH = 10,4)
 Fig. 16. The hydrolysis rate of H-LeuP[NH]Gly-OH **76** presented as linear and logarithmic decrease of substrate concentration versus time, at various adjusted initial values of pH (■ – pH = 11.7, ◆ – pH = 11.1, ● – pH = 10.9, ▲ – pH = 10.7, ▼ – pH = 10.4)



Rys. 17. Porównanie stałych szybkości hydrolizy fosfonamidów H-LeuP[NH]Gly-OH **76** (Δ) i H-LeuP[NH]Leu-OH **77** (○) przy różnych wartościach pH
 Fig. 17. Comparison of hydrolysis rate constants of phosphonamidates H-LeuP[NH]Gly-OH **76** (Δ) and H-LeuP[NH]Leu-OH **77** (○) at various values of pH



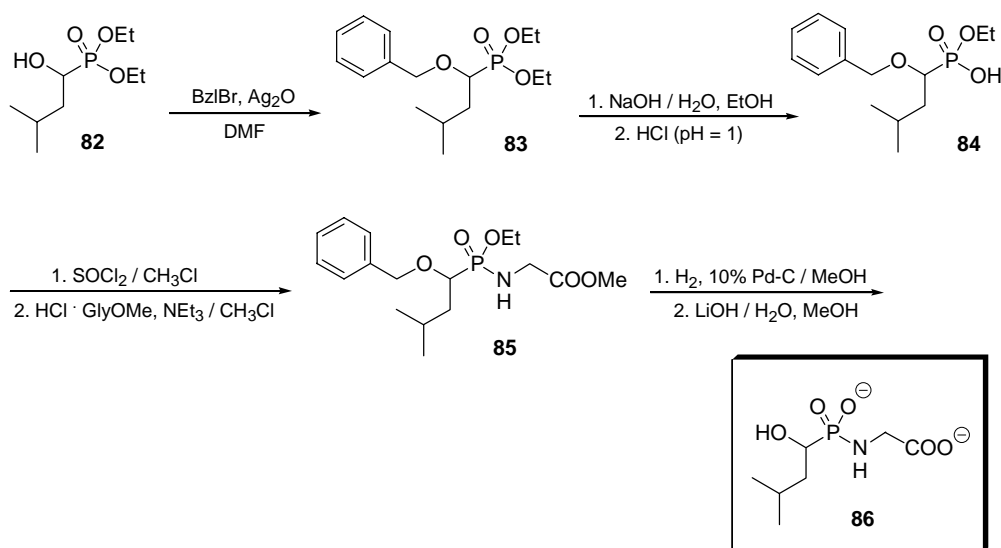
Rys. 18. Porównanie stałych szybkości hydrolizy fosfonamidów H–LeuP[NH]Gly–OH **76** (Δ) oraz H–LeuP[NH]Leu–OH **77** (\circ) wobec H–PhgP[NH]Bzl **81** (\square) – analogu, który nie zawiera C-terminalnej grupy karboksylowej (dla różnych wartości pH)

Fig. 18. Comparison of hydrolysis rate constants of phosphonamidates H–LeuP[NH]Gly–OH **76** (Δ) and H–LeuP[NH]Leu–OH **77** (\circ) to the hydrolysis rate constant of the analogue H–PhgP[NH]Bzl **81** (\square) not containing C-terminal carboxyl group. Hydrolysis was carried out at various values of pH

Integracja sygnałów pozwoliła na wyrażenie składu mieszaniny jako procentowego udziału niehydrolizowanego fosfonamidu **76**. Wartość tę przedstawiono w funkcji czasu na rysunku 16 dla różnych, ustalonych początkowo wartości pH roztworów. Zależności te posłużyły do obliczenia parametrów kinetycznych reakcji, która wykazuje typową charakterystykę „pseudo” pierwszego rzędu. Obliczone stałe szybkości dla obu analogów **76** i **77** przedstawiono na rysunku 17. Widoczny jest tutaj niewielki efekt steryczny reakcji, ponieważ sterycznie bardziej rozbudowany analog (H–LeuP[NH]Leu–OH, **77**) rozpadał się szybkością około dwukrotnie mniejszą.

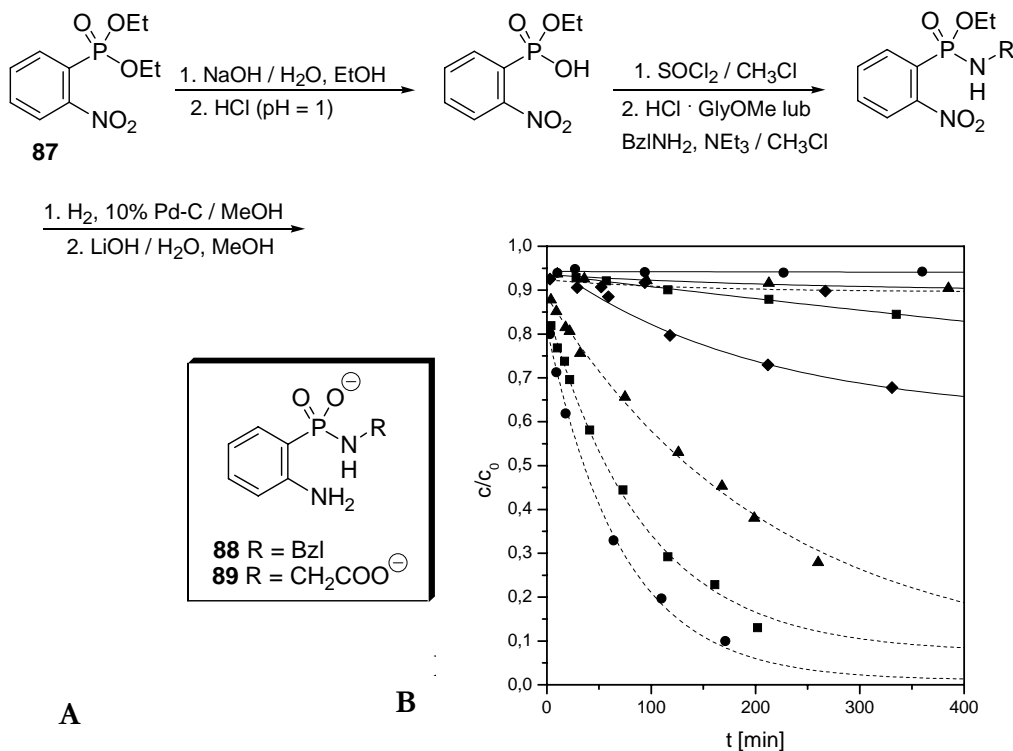
Odblokowanie dwóch grup: aminowej i fosfonamidowej ma zatem podstawowy wpływ na hydrolityczną stabilność tej ostatniej. Obecność C-terminalnej grupy karboksylowej okazała się natomiast mało znacząca. Dowiedziono tego, porównując szybkości hydrolizy związków zawierających grupę karboksylową **76** i **77** względem związku **81**, który nie ma tej funkcji (rys. 18). Mimo różnic strukturalnych nie zaobserwowano ani zmiany kinetyki reakcji, ani istotnych różnic w wartościach stałych „pseudo” pierwszego rzędu (rys. 18) [132].

W świetle przedstawionych powyżej wyników stało się oczywiste, że to obecność sąsiadującej grupy aminowej ma decydujące znaczenie dla labilności wiązania P–N. Aby niepodważalnie udowodnić, że ma to związek z jej zasadowym charakterem, przeprowadzono syntezę analogu dipeptydu, w którym została ona zastąpiona resztą hydroksylową (schemat 11) [131].



Schemat 11. Synteza fosfonamidowego analogu dipeptydu zawierającego terminalną resztę hydroksylową w miejsce aminowej
 Scheme 11. Synthesis of a phosphoramidate dipeptide analogue containing the terminal hydroxyl group replacing the amino group

Syntezę rozpoczęto od wprowadzenia benzylovej grupy ochronnej do cząsteczki substratu – hydroksyfosfonianu dietylowego **82**. Tak otrzymany związek **83** poddano hydrolizie

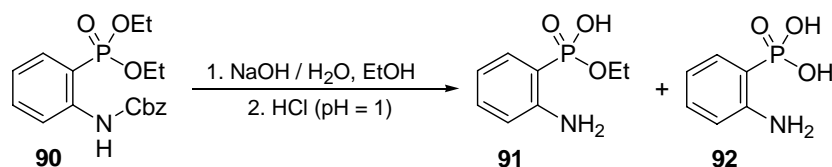


Schemat 12. Synteza związków fosfonamidowych **88**, **89** zawierających aromatyczną N-kończącą grupę aminową (A). Porównanie trwałości zmodyfikowanego analogu **88** (krzywe ciągłe: ● pH = 8,5; ▲ pH = 7,5; ■ pH = 6,5; ◆ pH = 5,8) ze związkiem **76** (krzywe przerywane: ◆ pH = 11,7; ▲ pH = 11,1; ■ pH = 10,9; ● pH = 10,7) (B)
 Scheme 12. Synthesis of phosphoramidates **88**, **89** containing aromatic N-terminal amino group (A). Comparison of stability of the modified analogue **88** (continuous lines: ● pH = 8.5; ▲ pH = 7.5; ■ pH = 6.5; ◆ pH = 5.8) to the stability of compound **76** (dashed lines: ◆ pH = 11.7; ▲ pH = 11.1; ■ pH = 10.9; ● pH = 10.7) (B)

otrzymując monoester **84**, który przekształcono w fosfonamid **85** w standardowy sposób. Po kończącej procedurę usunięciu grup ochronnych w podobnych warunkach jak dla Cbz otrzymano docelowy związek **86** [131]. Istotnie, okazał się on być znacząco bardziej stabilny niż H-LeuP[NH]Gly-OH **76**. W roztworze o pH = 8,5 nie odnotowano jego istotnej hydrolizy w ciągu tygodnia w temperaturze pokojowej (< 10%), podczas gdy związek **76** hydrolizuje w tych samych warunkach już w 90% w ciągu 10 min [131, 132]. Stała szybkości rozpadu hydroksyfosfonamidu **86** ($k = 6,4 \times 10^{-3}$), również zachodzącego według typowej kinetyki „pseudo” pierwszego rzędu, jest tysiąckrotnie mniejsza niż odpowiednia wartość dla analogu **76**, gdy pH = 11 [132]. Reasumując, fosfonamidy zawierające terminalną grupę hydroksylową wykazują trwałość zbliżoną do *N*-blokowanych analogów aminowych, a zasadowy charakter grupy sąsiadującej jest kluczowy dla katalizy reakcji hydrolizy funkcji P–N.

Kontynuując poprzednią myśl, podjęto ostateczną próbę modyfikacji tej grupy, a mianowicie zmniejszenie jej zasadowego/nukleofilowego charakteru. Zaprojektowano, otrzymano i zbadano trwałość fosfonamidów zawierających aromatyczną grupę aminową **88** i **89** w kontekście ich potencjalnego zastosowania jako inhibitorów LAP (schemat 12) [193].

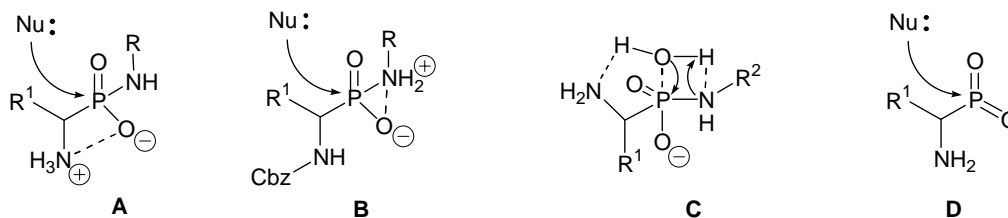
W trakcie syntezy stwierdzono, że standardowo stosowana benzyloksykarbonylowa reszta ochronna okazała się niedostatecznie użyteczna. Podczas zasadowej hydrolizy związku **90** obserwowano bowiem jej reakcję z sąsiadującą grupą fosfonową, a po zakwaszeniu uzyskiwano mieszaninę produktów, w których nie stwierdzono obecności funkcji karbaminianowej (schemat 13). Produktem przejściowym reakcji może być w tym przypadku sześcioczłonowy analog oksoazafosfolidyny, podobnie do zaproponowanego przez Hargera produktu cyklizacji *N*-benzyloksykarbonylo- α -aminoalkanofosfonochlorków w zasadowym środowisku (**65**, rys. 10) [186].



Schemat 13. Nieoczekiwane produkty rozpadu grupy karbaminianowej podczas zasadowej hydrolizy 2-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)benzenofosfonianu dietylu **90**

Scheme 13. Unexpected products of the carbamate decomposition during hydrolysis of diethyl 2-(*N*-benzyloxycarbonylamino)benzenephosphonate **90** in basic medium

W celu rozwiązania problemów powodowanych obecnością grupy aminowej zastosowano w reakcji substraty z grupą nitrową jako prekursorem grupy aminowej. Okazały się one w pełni kompatybilne z opracowaną procedurą i w końcowej fazie syntezy ulegają redukcji wodorem w takich samych warunkach jak Cbz–NH. Badania stabilności nowo otrzymanych analogów **88** i **89** w pełni potwierdziły poprawność przyjętych założeń. Związek **88** ulegał bowiem znaczącej hydrolizie dopiero w roztworze o pH = 6 (schemat 12). Jej szybkość jest porównywalna do zachowania analogu **76**, gdy pH = 11.



Rys. 19. Proponowane mechanizmy hydrolizy wiązania fosfonamidowego (komentarz w tekście)

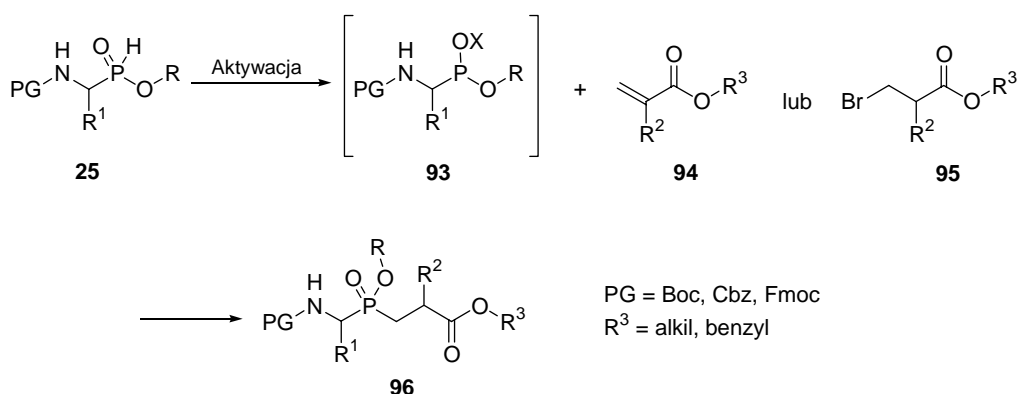
Fig. 19. Suggested mechanisms of phosphoramidate bond hydrolysis (description in the text)

Prowadzone badania stabilności, dotyczące różnorodnych fosfonamidów, pokazały, że tylko jednoczesna obecność niechronionej grupy aminowej sąsiadującej z ugrupowaniem fosfonamidowym skutkuje dużą nietrwałością związków zawierających wiązanie P–N. Dodatkowo udowodniono, że wpływ taki wywiera tylko alifatyczna funkcja aminowa. Jest to ewidentnie związane z możliwością jej protonowania nawet w zasadowych warunkach. Opierając się na tych przesłankach, można zaproponować kilka alternatywnych mechanizmów procesu rozpadu (rys. 19). Pierwszy z nich polega na klasycznej substytucji nukleofilowej na atomie fosforu. Protonowanie *N*-terminalnej reszty aminowej może kompensować ujemny ładunek fosfonamidu i ułatwić w ten sposób atak nukleofila (diagram **A**). Częsteczką wody jest lepszym nukleofilem w tym przypadku, ponieważ może dostarczać atomu wodoru istotnego dla protonowania grupy odchodzącej. W przypadku *N*-blokowanych pochodnych proces ten ma szansę zachodzić dopiero dla znacznie mniejszego pH niezbędnego do protonowania mniej zasadowego fosfonamidowego atomu azotu (**B**).

Konkurencyjną propozycją jest mechanizm hydrolizy zachodzącej przez cykliczny czteroczłonowy stan przejściowy (**C**), analogiczny do zaproponowanego dla amidów zawierających trójwartościowy atom fosforu [194]. Grupa α -aminowa może odgrywać tutaj dodatkową rolę stabilizującą stan cykliczny. Mimo że nie prowadzono badań zmierzających do rozstrzygnięcia, który z mechanizmów występuje, a przedstawione propozycje mają charakter spekulatywnych, to najmniej prawdopodobny wydaje się wariant polegający na tworzeniu metafosfonianu (**D**). Niemniej jednak ten dysocjatywny mechanizm jest często brany pod uwagę w literaturze do rozważania reaktywności związków fosforoorganicznych, np. w przypadku alkoholizy fosforamidów [195]. Nie wyjaśnia on jednak różnic w zachowaniu badanych związków w zależności od pH i stanu grup funkcyjnych fosfonamidu.

4. Synteza fosfinopeptydów

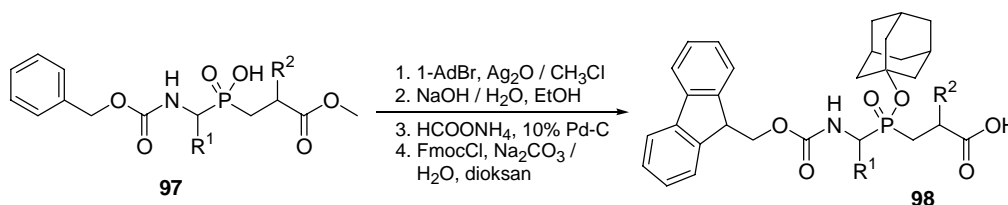
W odróżnieniu od chemii fosfonamidów opisanej w poprzednim rozdziale, synteza fosfinopeptydów rozwija się bardzo intensywnie i wielokierunkowo. Postęp ten stymulowany jest poszukiwaniem nowych związków regulujących działanie różnorodnych receptorów biologicznych, głównie metaloproteaz [58, 89–92]. Opracowanie metod rozbudowy podstawowego szkieletu fosfinodipeptydu oraz jego modyfikacji to główne obecnie kierunki badań w tej dziedzinie. Początkowe wyzwanie, jakim było otrzymanie fosfinowych analogów dipeptydów przez modyfikację kwasowej reszty odpowiednich α -aminoalkanofosfonianów, można obecnie uznać za satysfakcjonująco rozwiązane. Podsumowując dwudziestoletnie dokonania, należy stwierdzić, że spośród wielu opracowanych metod syntezy, większość dotyczy dającej bardzo dobre rezultaty addycji typu Michaela fosforowych nukleofili do elektrofilowego atomu węgla (schemat 14). Tematyka ta, wraz z jej różnorodnymi modyfikacjami, została podsumowana w bardzo aktualnym i obszernym przeglądzie [82] i jedynie częściowo zostanie tutaj przedyskutowana w kontekście prowadzonych badań własnych.



25	Aktywacja	93
R = H	HMDS, BTSA lub TMSCl / NEt ₃	R = X = SiMe ₃
R = alkil	HMDS, BTSA lub TMSCl / NEt ₃	R = alkil, X = SiMe ₃
R = alkil	MeONa lub <i>t</i> -BuOK	R = alkil, X = Na lub K

Schemat 14. Ogólna procedura syntezy fosfinowych analogów dipeptydów przez aktywację reszty *H*-fosfinowej do trójwartościowej pochodnej i reakcję z odpowiednim elektrofilem
 Scheme 14. General scheme of synthesis of phosphinate dipeptide analogs via activation of *H*-phosphinate moiety allowing its trivalent derivative to be obtained and reaction with an appropriate electrophile

Substratami w reakcji są *N*-chronione kwasy α -amino-*H*-fosfinowe **25** (R = H) lub ich estry **25** (R = alkil). W celu zwiększenia nukleofilowości atomu fosforu zostają one przekształcone w bardziej reaktywne diestry trójwiązalnego fosforu **93**. Zwykle dokonuje się tego przez zastosowanie odpowiednich odczynników silylujących, takich jak: chlorotrimetylosilan (TMSCl) w obecności aminy trzeciorzędowej, 1,1,1,3,3,3-heksametylodisilazan (HMDS), czy *N,O*-bis(trimetylosilylo)acetamid (BTSA) [82, 196–201]. W przypadku estrów fosfinowych **25** (R = alkil) równowaga może być przesunięta w stronę odpowiednich reaktywnych pochodnych zawierających trójwartościowy atom fosforu pod wpływem mocnych zasad, takich jak alkoholany: metanolan sodu lub *t*-butanolan potasu [121, 202–204]. Tak zaktywowane pochodne **93** reagują *in situ* z odpowiednimi elektrofilami, przede wszystkim z α -podstawionymi α,β -nienasyconymi estrami (akrylany) **94** w addycji typu Michaela lub bromoestrami **95** w reakcji Arbuzowa [82, 196–201]. Na ogół reakcje te przebiegają z bardzo dobrymi wydajnościami, a jedynym poważniejszym ograniczeniem stosowanej metody jest dostępność odpowiednio funkcjonalizowanych substratów elektrofilowych, tj. α -podstawionych akrylanów **94** (patrz rozdz. 4.1).

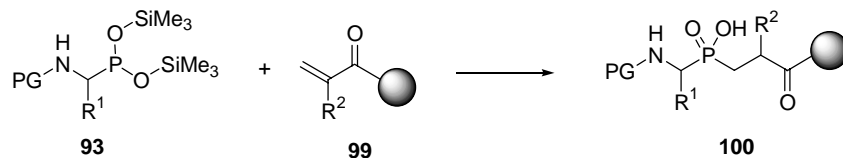


Schemat 15. Procedura otrzymywania fosfinodipeptydu o wzorze ogólnym **98** stosowanego jako „blok budulcowy” w standardowej strategii Fmoc syntezy peptydów na stałym nośniku, w syntezie równoległej oraz kombinatorycznej
 Scheme 15. The procedure used to obtain phosphinic dipeptides of general structure **98** applied as building blocks in standard Fmoc solid phase peptide synthesis, parallel and combinatorial synthesis

Rosnące znaczenie fosfinopeptydów w porównaniu do fosfonamidów wynika również z tego, że tylko te pierwsze zostały z powodzeniem zaadaptowane jako substraty w standardowej, zautomatyzowanej syntezie peptydów na stałym nośniku (SPPS, ang. *solid phase peptide synthesis*), a także w syntezie kombinatorycznej. Synteza kombinatoryczna to jedna z podstawowych obecnie metod poszukiwania nowych struktur wiodących oraz optymalizowania struktury związków o określonej aktywności biologicznej, w tym potencjalnych leków działających względem wybranych proteaz [205, 206]. W pierwszym doniesieniu literaturowym dotyczącym możliwości zastosowań SPPS, opisywano użycie dipeptydu Boc-PheP[CH₂]Gly-OH jako tzw. „bloku budulcowego” (ang. *building block*) do syntezy nonapeptydu według strategii Boc [207]. PyBOP okazał się w tym przypadku wydajnym czynnikiem sprzęgającym aktywującym selektywnie grupę karboksylową. Autorzy nie obserwowali żadnych reakcji ubocznych z udziałem niechronionej reszty fosfinowej. Przełomowym krokiem w tej dziedzinie było jednak opracowanie syntezy odpowiednio

chronionego substratu **98** – „bloku budulcowego” w pełni kompatybilnego ze stosowaną powszechnie obecnie w SPPS strategią Fmoc (schemat 15) [79]. Synteza takiego dipeptydu, na pozór prosta, ponieważ polegająca na kolejnych etapach protekcji i deprotekcji grup funkcyjnych, wymagała jednak opracowania procedury odpowiedniej ochrony reszty fosfinowej i udowodnienia, że spełnia ona warunek ortogonalności we wszystkich stadiach SPPS. Grupa 1-adamantylowa dobrze spełniała postawione warunki, a opracowana procedura wiodąca do związku **98** otworzyła drogę do zastosowania fosfinopeptydów w zautomatyzowanej syntezie równoległej i kombinatorycznej [80, 81].

Każdorazowe (odpowiednie podstawniki R¹ oraz R²) otrzymywanie tak chronionego pseudodipeptydowego bloku budulcowego **98** jest jednak długotrwałe i pracochłonne. Dlatego należy tutaj wspomnieć o podjętych próbach uproszczenia zarówno syntezy analogów fosfinodipeptydów w roztworze [203, 204, 208], jak i przeprowadzenia addycji Michaela bezpośrednio na żywicy polimerowej (schemat 16) [107, 209]. Jak udowodniono w tym drugim przypadku, ester silylowy odpowiedniego kwasu *H*-fosfinowego **93** może reagować z resztą akryloilową funkcjonalizującą stały nośnik **99**. Podstawowymi wadami tej drogi jest jednak mała wydajność (lub konieczność użycia bardzo dużych nadmiarów substratów i reagentów), konieczność zastosowania bardziej drastycznych warunków niż typowe dla procedury Fmoc, a także ograniczona dostępność odpowiednich komponentów elektrofilowych.

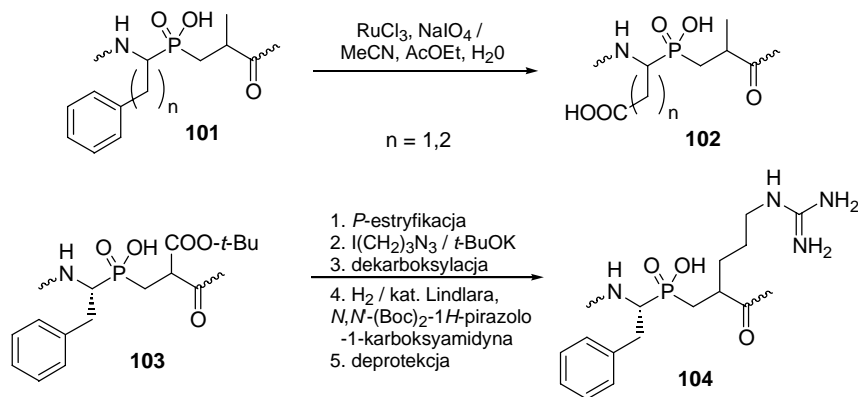


Schemat 16. Ogólny schemat reakcji syntezy fosfinodipeptydów z utworzeniem wiązania P–C na stałym nośniku

Scheme 16. General reaction of synthesis of phosphinic dipeptides with P–C bond formation on solid support

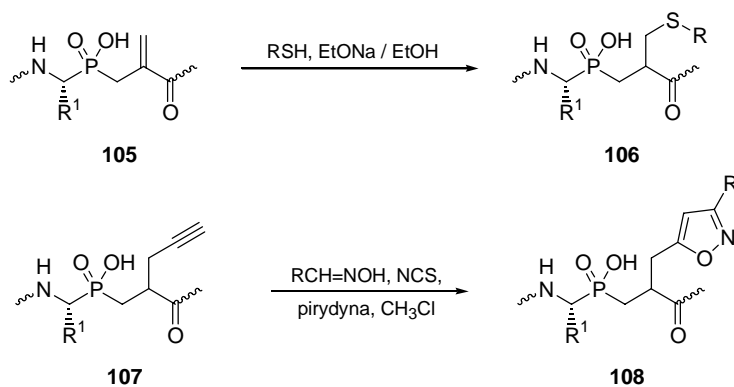
Wobec wymienionych ograniczeń najbardziej energicznie prowadzone są prace nad syntezą fosfinopeptydów, zmierzające do opracowania metod wielokierunkowej modyfikacji łańcuchów bocznych. Dotyczy to tzw. trudnych sekwencji, czyli wprowadzania funkcjonalizowanej reszty bocznej takich aminokwasów, jak: Asp, Glu czy Arg poprzez modyfikację podstawników P1 oraz P1' inhibitorów. Powinno się to odbywać na ostatnich etapach procedury, o ile to możliwe na stałym nośniku i bez konieczności izolowania kłopotliwych w syntezie substratów. Jak wielkie trudności sprawiają sekwencje zawierające dodatkową grupę funkcyjną w łańcuchu bocznym dobrze obrazuje przykład studiów prowadzonych przez Cowarda i współpracowników nad syntezą analogu H–GluP[CH₂]Glu–OH i jego pochodnych zaprezentowanych w serii obszernych artykułów [162, 210, 211]. Szerokie perspektywy wykorzystania mają także próby wprowadzenia takich podstawników, które mogą być prekursorami do dalszych, wielokierunkowych modyfikacji. Repre-

zentywne przykłady takiego nowatorskiego podejścia do problemu chemii fosfinopeptydów pokazano na schematach 17 oraz 18.



Schemat 17. Przykłady otrzymywania fosfinopeptydów zawierających dodatkowe grupy kwasowe lub zasadowe, takie jak w wielofunkcyjnych aminokwasach: Asp, Glu czy Arg, wprowadzane przez modyfikacje reszty bocznych P1 i P1'

Scheme 17. Examples of synthesis of phosphinic peptides containing acidic or basic functional side chain groups (Asp, Glu, Arg) introduced by modifications of P1 and P1' residues



Schemat 18. Przykłady kombinatorycznych modyfikacji nienasyconej reszty bocznej P1' fosfinopeptydów ($R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$)

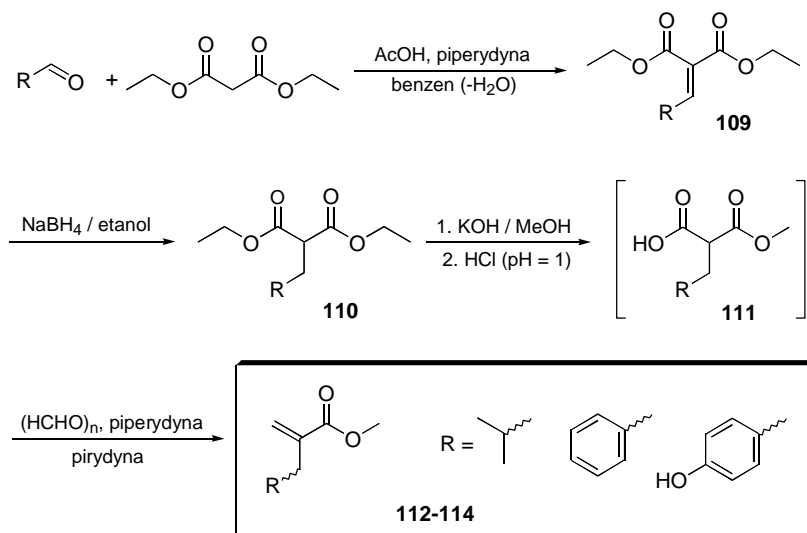
Scheme 18. Examples of combinatorial modifications of unsaturated P1' residues of phosphinic peptides ($R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$)

Przykładowo, pochodne zawierające kwasowe reszty boczne (Asp, Glu) **102** ($n = 1, 2$) otrzymano przez utlenienie pierścienia aromatycznego podstawnika w prekursorach **101** [104]. Natomiast resztę argininy w związku **104** uzyskano przez następujące kolejno: alkilowanie pochodnej malonianu **103** 1-azydo-3-jodopropanem, dekarboksylację, redukcję azydku i amidynowanie powstałej grupy aminowej (schemat 17) [212].

Nienasycone fragmenty boczne fosfinopeptydów pozwalają również na ich wielokierunkową modyfikację (schemat 18). Jako reprezentatywny przykład mogą służyć analogi dehydroalaniny **105**. Rezultatem addycji nukleofili tiolowych do związku **105** było otrzymanie serii *S*-podstawionych pochodnych cysteiny **106** [213, 214], które wykazały interesującą selektywność inhibicji względem przedstawicieli metaloproteaz matriksowych [214]. Udowodniono, że w podobny sposób reagują również inne nukleofile, np.: drugorzędowe aminy czy karboaniony malonianów [213]. W podobnym celu wykorzystano także obecność reszty propargilowej w pozycji P1' fosfinopeptydu **107**, syntezując serię izooksazolowych pochodnych **108** na drodze 1,3-dipolarnej cykloaddycji (schemat 18) [215]. We wszystkich podanych przykładach łagodne warunki prowadzenia reakcji umożliwiają jej zastosowanie również na stałym nośniku.

4.1. α -Podstawione akrylany jako substraty w syntezie fosfinopeptydów

Oprócz *N*-chronionych kwasów (lub estrów) α -aminoalkano-*H*-fosfinowych **25**, drugim kluczowym substratem w syntezie fosfinopeptydów **96** są α -podstawione α,β -nienasycone estry (α -podstawione akrylany) **94**. Wprowadzają one resztę boczną P1' do docelowej cząsteczki inhibitora, są więc odpowiednikami estrów aminokwasów **54** w syntezie pseudopeptydów fosfonamidowych **55**. W przeciwieństwie jednak do szerokiej gamy



Schemat 19. Procedura syntezy α -podstawionych akrylanów **112–114** – prekursorów fragmentu P1' leucyny, fenyloalaniny oraz tyrozyny w strukturze pseudopeptydów fosfinowych

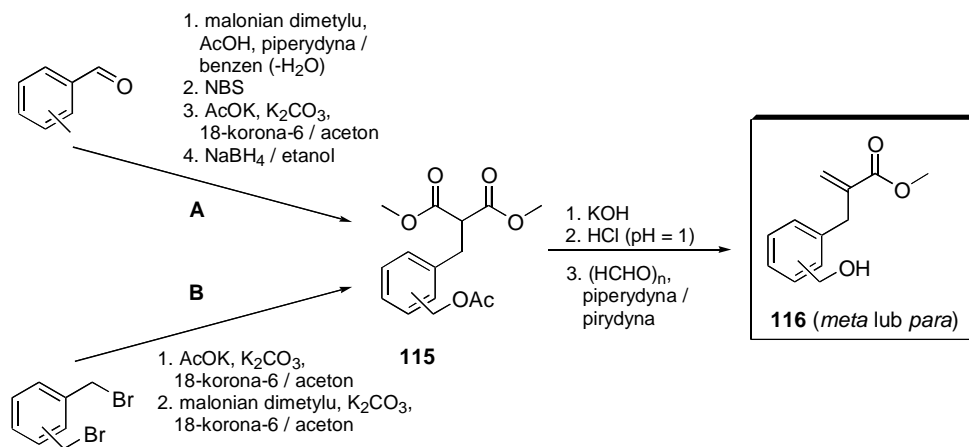
Scheme 19. Synthesis of α -substituted acrylates **112–114**, the precursors of the P1' fragment of leucine, phenylalanine and tyrosine in phosphinic pseudopeptide structure

aminoestrów, w tym przypadku handlowo dostępne są jedynie niepodstawione akrylany oraz metakrylany – prekursorzy fragmentu P1' glicyny oraz alaniny. Jest to podstawowe ograniczenie w szerokim stosowaniu addycji Michaela jako procedury syntezy fosfinopeptydów. Literatura oferuje kilka metod otrzymywania prostych analogów α -alkilowych lub α -arylowych akrylanów, w tym doskonałą procedurę opracowaną przez Stettera i Kuhlmana [216]. Jest to reakcja oparta na kondensacji Knoevenagela formaldehydu i monoestru malonianu połączona z dekarboksylacją tego ostatniego. Podstawowymi jej substratami są C-podstawione maloniany, które można uzyskać na wiele sposobów. Do najbardziej ogólnych i dających najlepsze rezultaty należy C-alkilowanie malonianu dialkilu, a także redukcja standardowych adduktów Knoevenagela otrzymywanych w reakcji aldehydu i malonianu dialkilu.

Tę drugą ścieżkę ich otrzymywania, uzupełnioną procedurą zaproponowaną przez Stettera i Kuhlmana, wykorzystano kolejno do syntezy malonianów o wzorze ogólnym **110** oraz α -podstawionych akrylanów **112–114** – prekursorów inhibitorów leucyloamino-peptydazy zawierających resztę leucyny, fenyloalaniny oraz tyrozyny w pozycji P1' (schemat 19) [131].

Kondensacja odpowiednich aldehydów z malonianem dietylu w warunkach azeotropowego usuwania wody zachodziła praktycznie z ilościową wydajnością. Otrzymane produkty o wzorze ogólnym **109** poddawano następnie redukcji borowodorkiem sodu w absolutnym alkoholu otrzymując podstawione maloniany **110**. Bez dalszego oczyszczenia przeprowadzano ich dyssymetryzację do związków **111** oraz kondensację z formaldehydem w zasadowych warunkach. Czyste, końcowe produkty **112–114** otrzymywano po destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem lub chromatografii cieczowej. Należy zauważyć, że procedura nie wymagała ochrony reszty hydroksylowej w przypadku użycia *p*-hydroksybenzaldehydu. Prowadziła ona do otrzymania nieopisanego dotąd związku **114** – prekursora tyrozyny, a sumaryczna wydajność tylko nieznacznie odbiegała od wydajności uzyskanych dla prostszych analogów.

Sytuacja znacznie bardziej się komplikuje w przypadku konieczności wprowadzenia dodatkowej grupy funkcyjnej w łańcuchu bocznym akrylanu. Trudności te dobrze ilustruje przykład modyfikacji wspomnianych inhibitorów LAP. Dwa z nich: H–hPheP[CH₂]Phe–OH oraz H–hPheP[CH₂]Tyr–OH wykazały praktycznie takie samo powinowactwo do enzymu, mimo obecności dodatkowej grupy hydroksylowej w przypadku analogu tyrozyny [131]. W myśl założeń teoretycznych, grupa –OH miała tworzyć odpowiednie wiązanie wodorowe z resztą amidową Asn330 kieszeni S1' LAP. Prawdopodobnie z powodu niekorzystnej geometrii takie oddziaływanie nie mogło nastąpić (dalsze szczegóły patrz rozdz. 5.2). Zwiększona swoboda rotacyjna funkcji hydroksylowej powinna sprzyjać przyjęciu konformacji właściwej do utworzenia wiązań wodorowych. W związku z tym zaprojektowano inhibitory zawierające w pierścieniu aromatycznym reszty fenyloalaniny grupę hydroksymetylową (w pozycji *meta* lub *para*). Podjęte próby otrzymania odpowiednich elektrofilowych substratów **116** do syntezy tego typu związków przedstawiono na schemacie 20 [217].

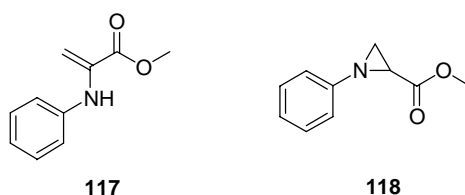


Schemat 20. Synteza α -benzylakrylanów modyfikowanych grupą hydroksymetylową w pozycji *meta* lub *para* pierścienia aromatycznego
Scheme 20. Synthesis of α -benzylacrylates modified with the hydroxymethyl group in *meta* or *para* position of the aromatic ring

Przetestowano i porównano obie możliwości, zarówno wiodącą przez redukcję produktu kondensacji Knoevenagela (droga **A**), jak i alkilowanie malonianu (droga **B**). Za grupę ochronną w obu przypadkach wybrano resztę acetylową wprowadzaną na wstępnym etapie syntezy. Ścieżka syntetyczna **A** jest wieloetapowa, niemniej jednak reakcje zachodzą z większymi wydajnościami i możliwe jest ich przeprowadzenie bez oczyszczania półproduktów. W przypadku drogi **B**, polegającej na następujących po sobie kolejnych alkilowaniach *meta*- lub *para*-bis(bromometylo)benzenu, konieczny jest chromatograficzny rozdział składników mieszaniny po każdym z etapów. Sumarycznie, w obu przypadkach maloniany **115** uzyskuje się z wydajnością 40–50%. Niestety, w kolejnym kroku nie jest możliwe przeprowadzenie selektywnej hydrolizy jednej grupy estrowej bez utraty acetylowej reszty ochronnej. Mimo tej niepożądanego deprotekcji reszty hydroksylowej, kondensacja z formaldehydem daje w rezultacie docelowe α,β -nienasycone związki **116** otrzymane według standardowej procedury Stettera i Kuhlmana, i oczyszczane chromatograficznie. Utrata grupy ochronnej zaniża jednak drastycznie sumaryczną wydajność syntezy takich akrylanów do 30–40%. Jak stwierdzono, przeprowadzając addycję kwasu fosfinowego do otrzymanych związków **116** (rozd. 4.2), obecność wolnej alifatycznej grupy –OH również nie ogranicza ich zastosowania jako substratów w addycji Michaela, chociaż wydajność procesu jest wyraźnie mniejsza.

Mimo znacznych trudności próba otrzymania akrylanów **116** zakończyła się jednak umiarkowanym powodzeniem. Natomiast próby syntezy *N*-fenylo- α -aminoakrylanu metylu (estru metylowego *N*-fenylodehydroalaniny) **117** nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Związek taki miał być prekursorem reszty anilinowej tworzącej zmodyfikowany podstawnik P1' nowych inhibitorów LAP. Wprowadzona do struktury drugorzędowa grupa aminowa miała za zadanie korzystnie oddziaływać z grupą karbonylową

Asp332 enzymu. Nie wchodząc w szczegóły eksperymentalne, zarówno kondensacja aniliny z pirogronianem, jak i reakcja Knoevenagela z użyciem formaldehydu i *N*-fenyloaminomalonianu, a także eliminacja pochodnych seryny zakończyły się niepowodzeniem. Może być to spowodowane nietrwałością takiego układu, który łatwo przegrupowuje do odpowiedniej aziridyny **118**. W rezultacie opracowano znacznie ogólniejszą procedurę modyfikacji fosfinopeptydów pozwalającą na wprowadzanie różnorodnych *N*-podstawników w pozycję P1' potencjalnych inhibitorów na drodze *N*-alkilowania (patrz rozdz. 4.2) [217, 218].



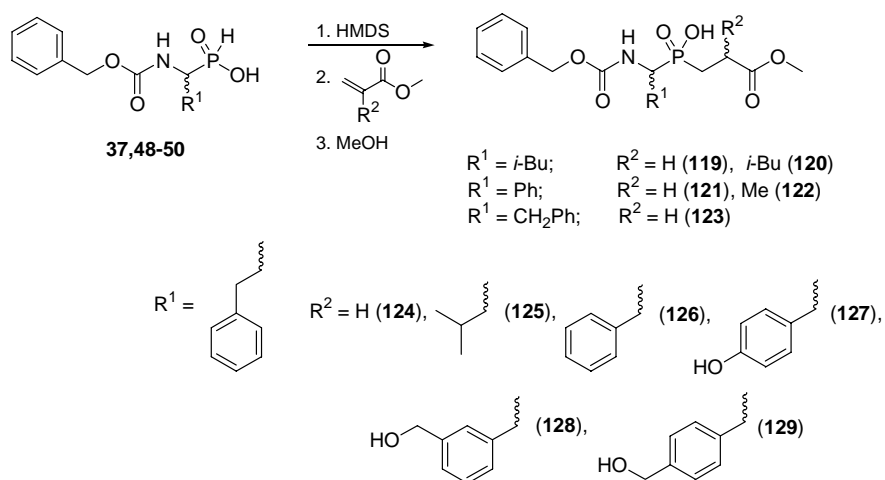
Rys. 20. Struktura *N*-fenylo- α -aminoakrylanu metylu **117**, prekursora reszty *N*-fenyloaminowej P1' i postulowanego produktu jego przegrupowania do aziridyny **118**

Fig. 20. Structure of methyl *N*-phenyl- α -aminoacrylate **117**, a precursor of P1' *N*-phenylamino residue, as well as the suggested product of its rearrangement to aziridine **118**

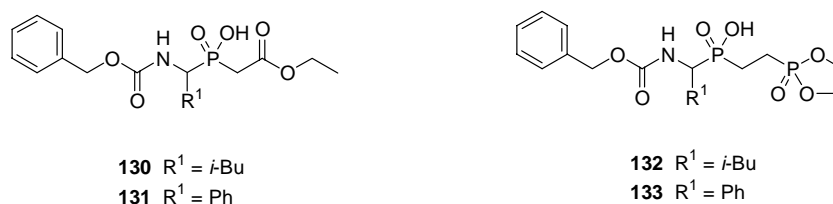
4.2. Otrzymywanie fosfinowych analogów dipeptydów oraz modyfikacja ich fragmentu P1'

W syntezie fosfinowych analogów pseudodipeptydów użyto sprawdzonej procedury addycji nukleofilowych estrów trimetylosililowych do odpowiednich akrylanów, zarówno handlowo dostępnych: akrylanu i metakrylanu metylu, jak i otrzymanych analogów **112–114** oraz **116** (schemat 21) [131, 217, 219, 220]. W celu przekształcenia wyjściowych związków w trójwartościowe estry fosfinowe stosowano standardową aktywację 1,1,1,3,3,3-heksametylodisilazanem w podwyższonej temperaturze (90–100 °C) w ciągu 2–3 godzin. Reakcja powinna przebiegać w atmosferze gazu obojętnego o wysokim stopniu czystości ze względu na podatność otrzymywanych półproduktów na utlenienie. Przykładowo podczas dostępu tlenu atmosferycznego oksydacja analogów fosfinowych do fosfonowych zachodzi ilościowo w ciągu godziny prowadzenia reakcji w podwyższonej temperaturze [221].

Do estru sililowego dodawano następnie odpowiedni akrylan i ponownie ogrzewano w nadmiarze HMDS do 80–100 °C (zależnie od temperatury wrzenia substratu) przez kolejne 2–3 godziny. Podobne warunki zapewniały również efektywne przyłączenie fosfinianów do innych elektrofilów, np.: bromoglicynianu etylu czy winylofosfonianu dimetylu i otrzymanie zmodyfikowanych strukturalnie fosfinopeptydów (rys. 21). Szczególnie interesująca wydaje się być nowa klasa, nieznanych dotąd w literaturze, fosfino-fosfonowych analogów **132** oraz **133** [220].



Schemat 21. Procedura syntezy fosfinowych analogów dipeptydów oraz struktury otrzymanych reprezentatywnych związków; dla substratu **50** ($\text{R}^1 = (\text{CH}_2)_2\text{Ph}$) struktury podstawników w produktach przedstawiono rozwiniętymi wzorami
 Scheme 21. Synthesis of phosphinate dipeptide analogues and the structures of the representative compounds obtained; for substrate **50** ($\text{R}^1 = (\text{CH}_2)_2\text{Ph}$) the structures of the substituents were shown in the form of full formulae

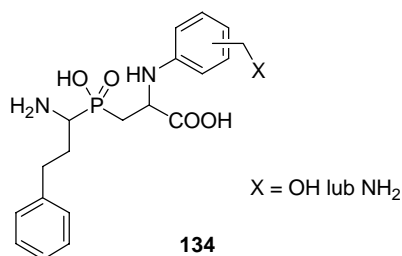


Rys. 21. Struktury zmodyfikowanych fosfinodipeptydów otrzymanych przez addycję estrów fosfinowych do elektrofilów innych niż akrylany
 Fig. 21. Structures of modified phosphinic dipeptides obtained by addition of phosphinate esters to electrophiles other than acrylates

Po ochłodzeniu nadmiar HMDS oraz silylowe pochodne fosfinianu rozkładano metanolem. Końcowe związki zawierające fragment glicyny w pozycji P1' **119**, **121**, **123**, **124** (będące mieszaniną racemiczną) oczyszczano poprzez krystalizację [131, 219, 220]. Natomiast w przypadku analogów **120**, **122**, **126–129** (będących mieszaniną dwóch diastereoizomerycznych par enancjomerów) stosowano chromatografię ciekłą [131, 217]. Pozwalało to uniknąć zmian w składzie stereoizomerycznym produktu, co jest szczególnie istotne w testach biologicznych. Reakcja addycji Michaela przebiega z niską indukcją asymetryczną ($de < 20\%$), a chromatograficzna procedura oczyszczania pozwala zachować udział izomerów zbliżony do równomolowego. Preparatywna wydajność związków otrzymanych tą metodą wynosiła 30–85% w zależności od struktury substratów. Naj-

większe przereagowanie obserwowano dla akrylanu metylu (> 70%), tylko nieznacznie gorsze dla bardziej rozbudowanych substratów **112**, **113**, a najmniej satysfakcjonujące dla elektrofilów zawierających dodatkowe grupy funkcyjne **114**, **116** (30–40%).

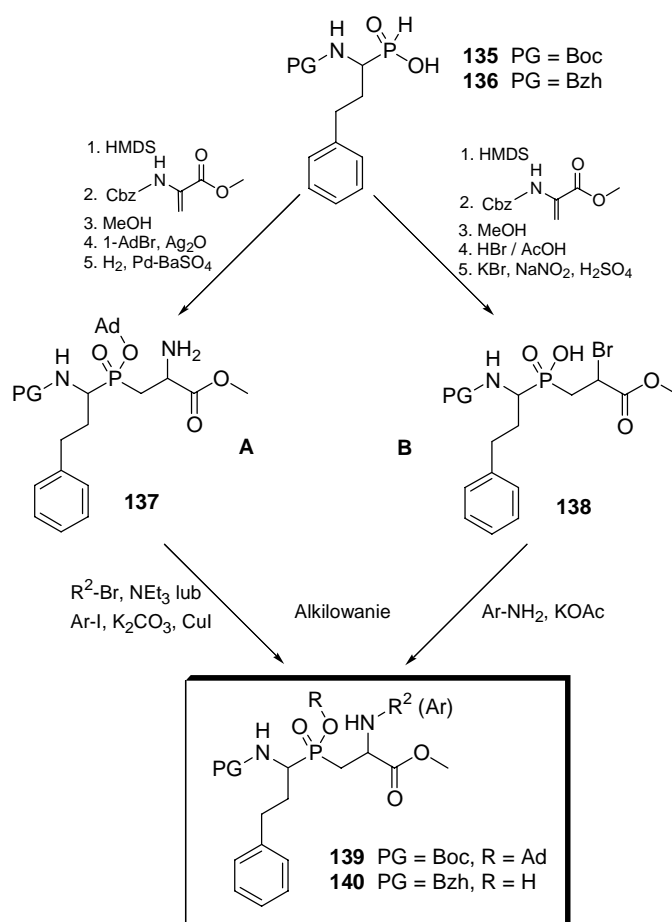
Niezwykle interesującą, nową klasą zaprojektowanych inhibitorów leucyloaminopeptydazy, okazały się analogi fosfinodipeptydów o wzorze ogólnym **134** zawierające grupę aminową w podstawniku P1' (rys. 22) [217, 218]. Na podstawie wyników modelowania molekularnego spodziewano się, że grupa ta utworzy wiązanie wodorowe z C=O Asp332 w centrum aktywnym. Co więcej, odpowiednia modyfikacja podstawnika przez funkcjonalizację reszty fenylovej (–CH₂OH lub –CH₂NH₂, w pozycji *meta* lub *para* podobnie do związków **128** oraz **129**) powinna zoptymalizować oddziaływania z wnęką wiążącą S1' LAP w wyniku interakcji z boczną resztą amidową Asn330 (patrz rozdz. 5.2).



Rys. 22. Ogólna struktura zmodyfikowanych w pozycji P1' inhibitorów leucyloaminopeptydazy dających możliwości tworzenia nowych, specyficznych oddziaływań w regionie S1' centrum aktywnego enzymu
Fig. 22. General structure of leucine aminopeptidase inhibitors modified in their P1' position, allowing novel and specific interactions in the S1' region of the enzyme active site

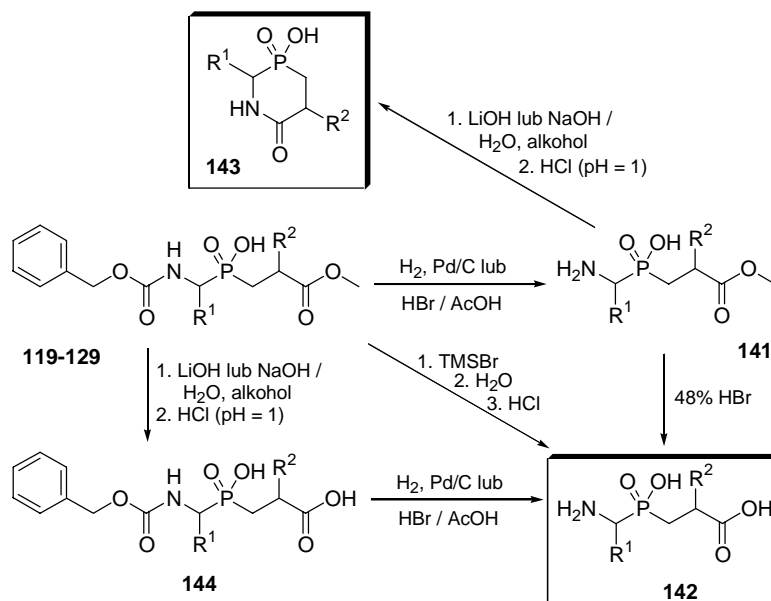
Niestety, jak zaznaczono w rozdziale 4.1, już synteza najprostszego bezpośredniego prekursora takich związków, tj. *N*-fenylo- α -aminoakrylanu **117**, nie powiodła się. We współpracy z Zespołem prof. Yiotakisa (Uniwersytet Ateński) opracowano znacznie bardziej uniwersalną metodologię alkilowania, pozwalającą na wprowadzanie dowolnych podstawników P1' w końcowych etapach syntezy, do gotowego, podstawowego szkieletu fosfinodipeptydu (schemat 22) [217, 218]. Początkowo prowadzono addycję *N*-*t*-butyloksykarbonylowej pochodnej homofenyloalaniny **135** (PG = Boc) do estru metylowego *N*-benzyloksykarbonylodehydoalaniny (otrzymanej przez eliminację odpowiedniego analogu seryny). Po wprowadzeniu 1-adamantylowej grupy ochronnej reszty fosfininowej i selektywnym usunięciu karbaminianu otrzymano związek **137** zawierający wolną grupę aminową we fragmencie P1'. Mogła ona zostać poddana standardowemu alkilowaniu przy użyciu odpowiednich halogenopochodnych (ścieżka **A**). Rzeczywiście dla bromków alifatycznych (pochodnych benzyloaminy) osiągnięto bardzo dobre rezultaty. W przypadku jodków aromatycznych natomiast tylko z zastosowaniem układu K₂CO₃/CuI jako zasada/katalizator osiągnięto docelowe produkty **139**, ale ich wydajności były mało satysfakcjonujące (~20%). Wobec

tych trudności dodatkowo zmodyfikowano procedurę i w warunkach diazowania przeprowadzono substytucję grupy aminowej otrzymując odpowiednią bromopochodną **138** (ścieżka **B**). Wymagało to jednak użycia znacznie bardziej odpornej na hydrolizę grupy benzhydrylowej (PG = Bzh) do ochrony reszty aminowej substratu **136**. Tak podstawiony fosfinopeptyd **138** efektywnie alkiluje zarówno alifatyczne, jak i aromatyczne aminy w łagodnych warunkach. Stanowi więc bardzo korzystny półprodukt do syntezy dowolnie modyfikowanych aminopochodnych we fragmencie P1' potencjalnych inhibitorów [217]. Różnorodne związki otrzymane według tej ogólnej procedury zostały poddane testom na aktywność względem leucyloaminopeptydazy (rozd. 5.2).



Schemat 22. Procedura alkilowania z użyciem fosfinowych analogów dipeptydów **137**, **138** i otrzymywania związków modyfikowanych we fragmencie P1' grupą aminobenzylową lub aminofenylną oraz ich pochodnymi

Scheme 22. Alkylation procedure with the application of phosphinate dipeptide analogues **137**, **138** leading to compounds modified in their P1' fragment by aminobenzyl or aminophenyl group as well as their derivatives



Schemat 23. Warunki deprotekcji grup funkcyjnych fosfinowych analogów dipeptydów **119–129** oraz obserwowane produkty uboczne

Scheme 23. Conditions of functional group deprotection in phosphinate dipeptide analogues **119–129** and the by-products observed

Deprotekcja grup funkcyjnych w chronionych fosfinodipeptydach **119–129** i następnie otrzymanie wolnych analogów opisanych wzorem ogólnym **142** nie jest sprawą oczywistą. Resztę *N*-benzyloksykarbonylową można co prawda usunąć w łagodnych warunkach hydrogenolizy w obecności katalizatora palladowego lub pod działaniem bromowodoru w kwasie octowym, otrzymując pochodne **141**, ale jeżeli obie te procedury przebiegają z praktycznie ilościową wydajnością, to dalsza hydroliza estru metylowego nastęrcza już pewne trudności (schemat 23). W zasadowych warunkach następuje bowiem cyklizacja dipeptydu do fosfinowego analogu diketopiperazyny **143**. Przykładowo dla hydrolizy pochodnej leucyloleucyny ($R^1 = R^2 = i\text{-Bu}$) cykliczny produkt stanowi około 70% mieszaniny poreakcyjnej [131]. Z drugiej strony, próby hydrolizy w warunkach kwaśnych wykazały niezwykłą odporność estrów metylowych **141**: 24-godzinne ogrzewanie w stężonym kwasie solnym powoduje rozszczepienie około 40% pochodnej leucyloglicyny ($R^1 = i\text{-Bu}$, $R^2 = \text{H}$). Pełną hydrolizę tego związku osiągnięto dopiero przy 48-godzinnym

ogrzewaniu w 40% kwasie bromowodorowym. Kontrastuje to z opisaną w literaturze łatwością hydrolizy estrów fosfinowych, których większą reaktywność tłumaczono katalitycznym wpływem sąsiadującej grupy karboksylowej (amidowej) tworzącej cykliczny mieszanek bezwodnik fosfino-karboksylowy [222, 223].

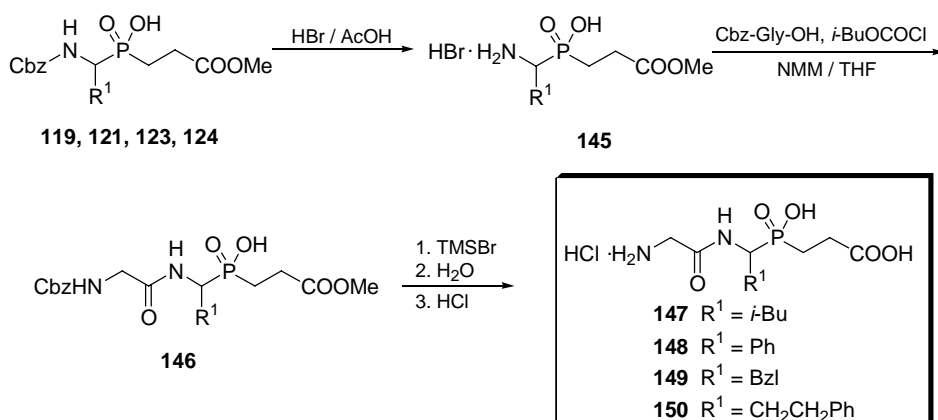
Użycie tak drastycznych warunków jak wrzący 48% HBr powoduje w niewielkim stopniu również rozpad wiązania P–C. Dlatego też rekomendowaną, dwuetapową ścieżką deprotekcji wiodącą poprzez dikwas **144** jest usunięcie grupy Cbz w drugiej kolejności, poprzedzone alkaliczną hydrolizą estru –COOMe. Taka metodologia oferuje najłagodniejsze warunki prowadzenia reakcji i zapewnia praktycznie ilościowe wydajności obu etapów. Alternatywą dla niej może być jednoetapowe użycie w dużym nadmiarze trimetylobromosilanu (TMSBr) w bezwodnym rozpuszczalniku. Procedura ta znajduje szczególne zastosowanie dla fosfinopeptydów **144**, które zawierają podstawnik o małej hydrofobowości, a zatem trudno je wydzielić po zakwaszeniu wodnego roztworu po pierwszym etapie zasadowej hydrolizy.

4.3. Wydłużanie sekwencji fosfinodipeptydów

Elongacja C-końca fosfinodipeptydów może odbywać się z użyciem standardowych środków sprzęgających stosowanych do syntezy wiązania amidowego. Najczęściej stosowana obecnie metoda aktywacji to przemiana grupy karboksylowej w ester benzotriazolu z użyciem takich odczynników jak: karbodiimid / HOBt, BOP czy PyBOP [121, 207, 208, 213–215, 224, 225]. Podobnie jak w przypadku prób syntezy fosfonamidów z monoestrów fosfonowych (patrz rozdz. 3) nie obserwuje się (lub w minimalnym stopniu) aktywacji grupy fosforowej. Dlatego do otrzymania z satysfakcjonującą wydajnością pojedynczych peptydów, zarówno na stałym nośniku, jak i w roztworze, ochrona funkcji fosfinowej nie jest wymagana. Nieco inaczej przedstawia się sprawa syntezy kombinatorycznej, gdzie stopień przereagowania na każdym z etapów syntezy oraz deprotekcji musi być bardzo wysoki, a reakcje uboczne wyeliminowane lub ograniczone do minimum. Tylko w ten sposób otrzymywane biblioteki kombinatoryczne mają wiarygodny skład, tj. równomierną reprezentację wszystkich składników. Dla takich zastosowań konieczne jest zabezpieczenie fosfinianu, np. grupą 1-adamantylową [79].

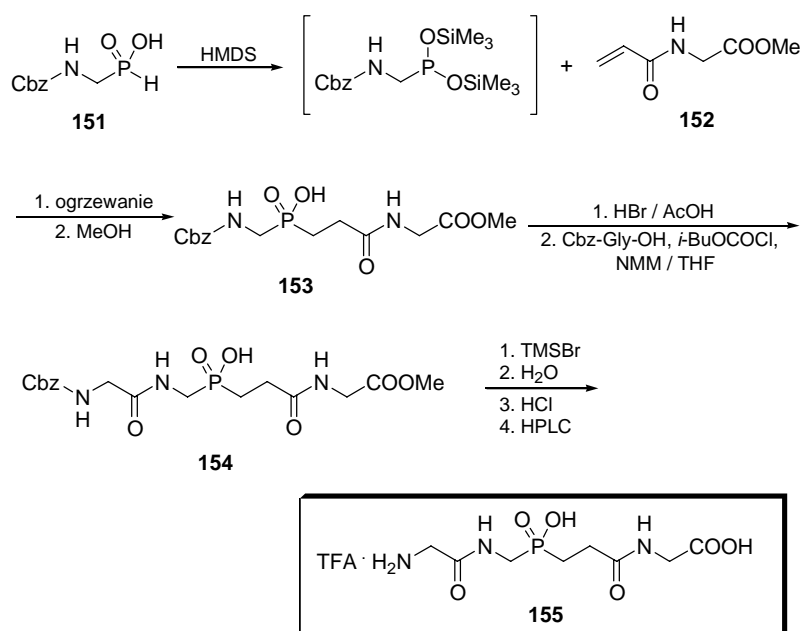
Nieco mniej doniesień literaturowych dotyczy wydłużania sekwencji N-końca fosfinodipeptydów. Niemniej jednak warunki rozbudowy szkieletu peptydowego są podobne jak dla C-końca [121, 207]. Syntezując serię fosfinotripeptydów jako inhibitorów katepsyny C, przetestowano inną możliwość prowadzenia takiej reakcji w roztworze, a mianowicie z zastosowaniem niesprawdzanej dotychczas dla fosfinopeptydów metody mieszanych bezwodników (schemat 24) [219].

Substratami były analogi dipeptydów o wzorze ogólnym Cbz–AaaP[CH₂]Gly–OMe **119**, **121**, **123**, **124** otrzymane w standardowy sposób (schemat 21). Po selektywnym usunięciu ochronnej reszty benzyloksykarbonylowej otrzymane bromowodorki o wzorze



Schemat 24. Rozbudowa fosfinodipeptydów poprzez acylowanie *N*-końca metodą mieszanych bezwodników

Scheme 24. Elongation of phosphinic dipeptides by *N*-terminal acylation using the mixed anhydride method



Schemat 25. Synteza fosfinowego analogu tetraglicyny jako potencjalnego inhibitora autolizyny LytM

Scheme 25. Synthesis of the phosphinic tetraglycine analogue as potential inhibitor of autolysin LytM

Oprócz standardowych metod, interesującym, nieeksploatowanym sposobem rozbudowy C-końca fosfinopeptydów wydaje się być przeprowadzenie addycji Michaela aminofosfinianu do odpowiednio modyfikowanych elektrofilu – akryloilowych pochodnych aminoestrów lub ich krótkich peptydów. Pomysł taki zastosowano do otrzymania fosfinowego analogu tetraglicyny (schemat 25) jako potencjalnego inhibitora autolizyny LytM [226], metalozależnego enzymu bakteryjnego z grupy lizostafin zaangażowanego w hydroлизę wiązania –Gly–Gly– w naturalnych pentapeptydowych połączeniach obecnych w ścianach komórkowych [227].

Początkowo, w osobnej reakcji, otrzymano *N*-akryloiloglicynian metylu **152**. Klasyczna metoda sprzęgania z użyciem chloromrówczanu izobutyli okazała się w tym przypadku bardziej efektywna niż acylowanie aminoestru chlorkiem akryloilu. Otrzymany związek z bardzo dobrą wydajnością ulegał addycji do aktywowanego kwasu *N*-benzyloksykarbonylometano-*H*-fosfinowego **151**. Należy zaznaczyć, że ten fosfinowy analog glicyny to jeden z najtrudniejszych do otrzymania aminofosfonianów i dopiero niedawno opracowano powtarzalne metody jego syntezy [203, 204, 228]. Usunięcie reszty benzyloksykarbonylowej oraz rozbudowa *N*-końca tripeptydu o kolejną resztę glicyny nastąpiła analogicznie do reakcji przedstawionej poprzednio dla krótszych analogów [219]. Docelowy fosfintetrapeptyd **155** wydzielono po usunięciu grup blokujących i oczyszczeniu metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej.

5. Badania aktywności peptydów fosfonamidowych i fosfinowych jako inhibitorów wybranych metaloproteaz

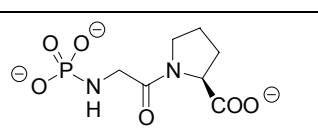
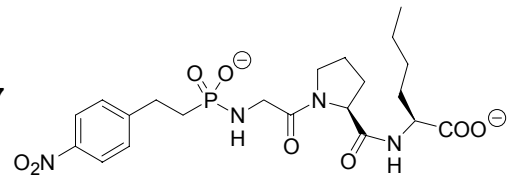
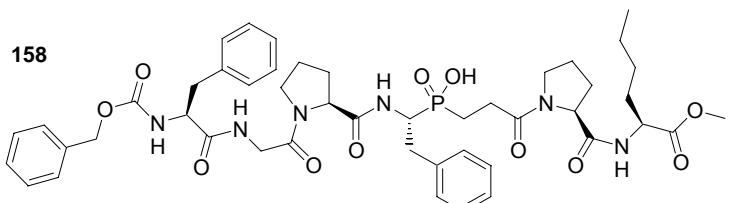
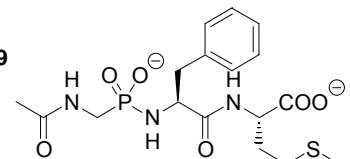
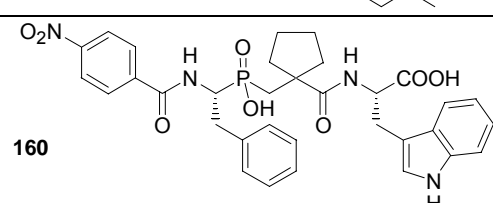
Idea sterycznego i elektronowego podobieństwa grupy fosfonamidowej oraz fosfino-wej do wysokoenergetycznego stanu przejściowego enzymatycznej hydrolizy wiązania amidowego [30, 31, 54, 60, 62, 85–87, 229] zaowocowała opracowaniem bardzo aktywnych inhibitorów pseudopeptydowych dla różnorodnych przedstawicieli przynajmniej dwóch spośród czterech podstawowych klas enzymów proteolitycznych: metaloproteaz [58, 89–91, 153] oraz proteaz asparaginowych [58, 230, 231]. We wprowadzeniu do niniejszej pracy (rozdz. 1) szeroko omówiono reprezentatywne przykłady zastosowania (od mechanistycznych badań podstawowych do opracowania komercyjnych środków terapeutycznych) tego typu związków w inhibicji peptydaz metalozależnych, takich jak: termolizyna, karboksypeptydaza A oraz enzym konwertujący angiotensynę (ACE). Nie wyczerpuje to jednak literaturowych przykładów badań ukierunkowanych na inne potencjalne cele w tej grupie enzymów. Uzupełniając je, należy wymienić efektywne użycie fosfonamidów do hamowania aktywności metaloproteaz, takich jak: bakteryjna kolagenaza (związki **156** oraz **157**, tabela 7) [232, 233], enkefalinaza (**159**) [166] oraz endopeptydazy 24.16 i 24.25 [234, 235]. Jeszcze powszechniejsze zastosowanie znalazły odporne na hydrolizę fosfinopeptydy. Użyto je w badaniach regulacji aktywności peptydaz, takich jak: bakteryjna kolagenaza (np. związek **158**) [168, 236], enzym konwertujący endotelinę – ECE (np. związek **160**) [237–239], astacyna [57], aminopeptydaza A [240], aminopeptydaza N – APM (związek **161**) [223, 241], dehydrodipeptydaza I [242] oraz endopeptydazy: 24.11 – neprylizyna, NEP (związki **160–162**) [223, 238, 241], 24.15 (związek **162**) [80] i 24.16 (związek **163**) [81]. Reprezentatywne struktury takich inhibitorów przedstawiono w tabeli 7, inhibitory metaloproteaz matriksowych natomiast omówiono osobno w rozdziale 5.1.

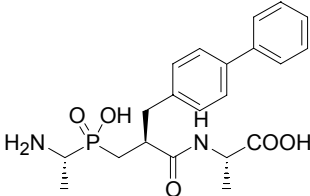
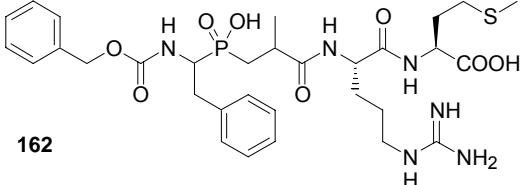
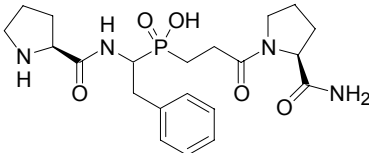
Z przedstawionych wyników kilka zasługuje na szczególną uwagę. Ciekawe rezultaty osiągnięto w laboratorium firmy Schering–Plough w pracy nad inhibitorami enzymu konwertującego endotelinę [237, 238], metaloproteazy o potencjalnym znaczeniu w leczeniu nadciśnienia i chorób sercowo-naczyniowych. Opierając się na strukturze fosforamidonu **4** oraz jednego z glutaramidów opracowanych przez firmę Pfizer hamującego zarówno ACE jak i NEP, skonstruowano związek **160** wykazujący duże powinowactwo względem wszystkich trzech wymienionych enzymów [238]. Osobnym, pomyślnie zrealizowanym wyzwaniem syntetycznym było wprowadzenie usztywniającego strukturę podstawnika cyklopentylowego w pozycję P1' cząsteczki inhibitora. Serię inhibitorów o równoczesnym działaniu względem aminopeptydazy N i neprylizyny, np. **161** opracowali Roque i współpracownicy [223, 241]. W organizmie oba te enzymy są zaangażowane między innymi w metabolizm

enkefalin, endogennych peptydów opioidowych odgrywających znaczenie w mechanizmie kontroli bólu. Regulacja ich aktywności może skutkować otrzymaniem środków terapeutycznych pomocnych w leczeniu różnego rodzaju stanów bólowych i stanowiących alternatywę do użycia uzależniających pochodnych alkaloidów. W administracji *in vivo* związki fosfinowe wykazały pozytywny efekt nocyceptywny bez widocznych efektów ubocznych, co może wskazywać na możliwość przekraczania przez nie bariery krew–mózg [241].

Tabela 7. Reprezentatywne przykłady fosforamidowych, fosfonamidowych oraz fosfonowych inhibitorów metaloproteaz

Table 7. Representative examples of phosphoramidate, phosphonamidate and phosphinate inhibitors of metalloproteases

Inhibitor	Aktywność inhibitorowa: K_i lub IC_{50} (badany enzym)	Lit.
<p>156</p> 	$K_i = 50$ nM (kolagenaza bakteryjna)	[232]
<p>157</p> 	$K_i = 5$ nM	[233]
<p>158</p> 	$K_i = 0,6$ nM	[168]
<p>159</p> 	$K_i = 850$ nM (enkefalinaza) $K_i = 3400$ nM (ACE)	[166]
<p>160</p> 	$IC_{50} = 50$ nM (ECE) $IC_{50} = 1,5$ nM (ACE) $IC_{50} = 55$ nM (NEP)	[238]

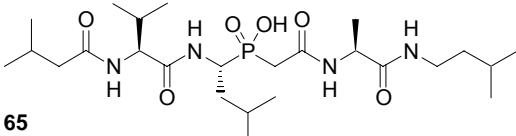
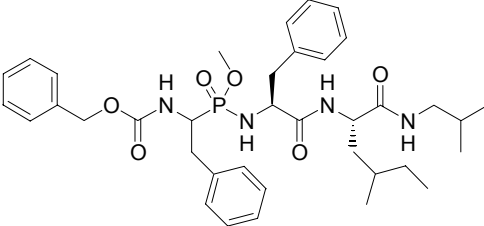
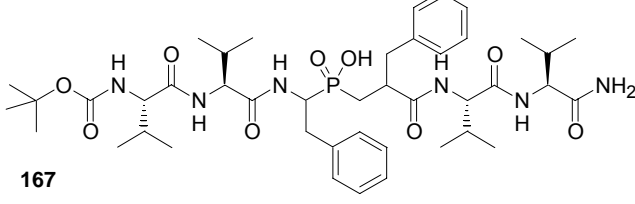
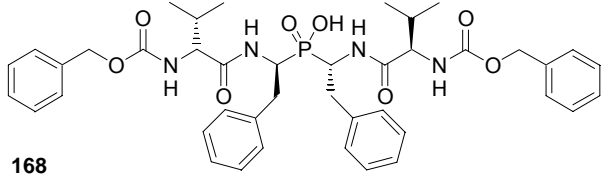
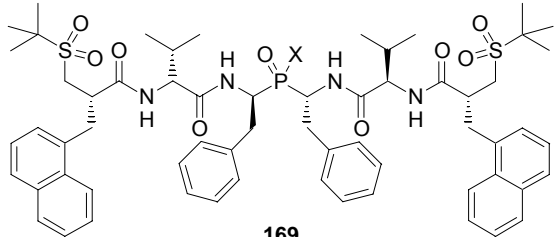
<p>161</p> 	<p>$K_i = 1,2 \text{ nM}$ (NEP)</p> <p>$K_i = 2,9 \text{ nM}$ (APM)</p>	<p>[223, 241]</p>
<p>162</p> 	<p>$K_i = 0,07 \text{ nM}$ (24.15)</p>	<p>[80]</p>
<p>163</p> 	<p>$K_i = 4 \text{ nM}$ (24.16)</p>	<p>[81]</p>

Jednym z największych wyzwań stawianych przy opracowaniu większości nowych efektorów użytecznych w terapii jest jednak selektywność ich działania. Najbardziej spektakularne wyniki na tym polu osiągnięto w przypadku fosfinopeptydów z zastosowaniem metod chemii kombinatorycznej [79–81]. Dobrze ilustruje to przykład znalezienia selektywnych niskocząsteczkowych inhibitorów dla dwóch pokrewnych metaloendopeptydaz: 24.15 oraz 24.16 wykazujących wysoką, 60% homologię sekwencji oraz bardzo zbliżoną specyficzność substratową. Systematyczne badanie bibliotek fosfinopeptydów pozwoliło na zidentyfikowanie struktur tetrapeptydów wykazujących niezwykle dużą aktywność, odpowiednio: **162** względem 24.15 oraz **163** względem 24.16. Co ważniejsze, dla każdego ze związków współczynnik selektywności inhibicji jednego enzymu w stosunku do drugiego przekraczał trzy rzędy wielkości [80, 81].

Analogi peptydów zawierające niehydrolizowalne enzymatycznie wiązanie fosfonamidowe lub fosfinowe okazały się również świetnymi inhibitorami enzymów proteolitycznych z grupy asparaginowych (tabela 8), takich jak: renina (np. związek **164**) [121], pepsyna (np. związek **165**) [243], penicylopepsyna [244], a przede wszystkim proteaza wirusa HIV-1 (związki **166–169**) [170, 172, 175, 245–248].

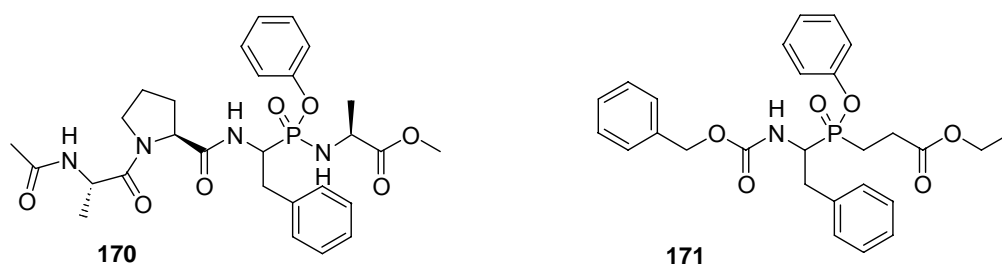
Należy zwrócić uwagę na to, że przedstawione związki to przede wszystkim fosfinopeptydy oraz mają bardzo rozbudowaną strukturę. Jest to skutkiem zastosowania strategii zastąpienia rozszczepialnego wiązania amidowego stabilnym ugrupowaniem P-CH₂ na podstawie oligopeptydowych sekwencji naturalnych substratów lub inhibitorów tych enzymów. W przypadku inhibitora reniny przyjęta strategia polegała na otrzymaniu związku **164**, który zawiera grupę fosfinową między resztami leucyny i waliny decapeptydu reprezentującego fragment 5–14 sekwencji angiotensynogenu [121]. Podobne rozwiązanie

Tabela 8. Reprezentatywne przykłady fosfonamidowych oraz fosfinowych inhibitorów proteaz asparaginowych
 Table 8. Representative examples of phosphonamidate and phosphinate inhibitors of aspartate proteases

Inhibitor	Aktywność inhibitorowa: K_i lub IC_{50} (badany enzym)	Lit.
164 H-Pro-His-Pro-Phe-His-LeuP[CH ₂]Val-Ile-His-Lys-OH	$IC_{50} = 75$ nM (renina)	[121]
 165	$K_i < 0,07$ nM (pepsyna)	[243]
 166	$IC_{50} = 2000$ nM (proteaza wirusa HIV-1)	[175]
 167	$K_i = 0,4$ nM (pH = 6,5) $K_i = 0,04$ nM (pH = 4,5)	[246]
 168	$K_i = 2,8$ nM	[247]
 169	$IC_{50} = 0,5$ nM (X = OH) $IC_{50} = 1$ nM (X = NH ₂)	[248]

zastosował Bartlett, konstruując niezwykle aktywny efektor pepsyny **165** oparty na strukturze jej naturalnego inhibitora – pepstatyny [243]. W tym przypadku do syntezowanej cząsteczki wprowadzono fosfinodipeptyd powstały przez formalne zastąpienie fragmentu CH–OH resztą P(O)OH w strukturze naśladowującej statynę, czyli kwas (3*S*,4*S*)-4-amino-3-hydroksy-6-metyloheptanowy, który jest obecny w naturalnym odpowiedniku.

Ze względu na znaczenie problemu zwalczania AIDS wiele uwagi poświęcono proteazie wirusa HIV–1 jako potencjalnemu celowi w terapii antywirusowej [16–19, 230]. Związki fosforoorganiczne wykazały zróżnicowane możliwości hamowania aktywności tej peptydazy. Umiarkowanie ciekawe wyniki inhibicji osiągnięto dla fosfonamidów [170, 172, 175]. Całkowicie blokowane związki tego typu (np. **166**) nie wykazywały istotnej różnicy w powinowactwie do enzymu dla poszczególnych diastereoizomerów [172, 175], co może oznaczać ich mało specyficzne wiązanie w centrum aktywnym enzymu. Częściowo odblokowane analogi charakteryzowały się typową dla ich struktury nietrwałością wiązania P–N [170]. Znacznie bardziej interesujące rezultaty otrzymano w przypadku fosfinopeptydów. Pierwsze próby syntezy inhibitorów proteazy wirusa HIV–1 zawierających wiązanie P–C, oparte były na ich podobieństwie do pierwszorzędowej struktury naturalnego substratu [245]. Grobelny i współpracownicy [246] uzyskali bardzo małe wartości stałych K_i dla inhibitorów o hydrofobowym charakterze zawierających w swojej sekwencji identyczne reszty boczne we fragmentach Pn oraz Pn', np. Phe–Val–Val w związku **167**. W konsekwencji, spektakularny sukces przyniosła idea konstrukcji inhibitorów (np. **168** oraz **169**) [247, 248] zainspirowana przez architekturę enzymu, który ma budowę homodimeru o symetrii C_2 [249, 250]. Pełne dopasowanie do centrum aktywnego enzymu osiągnięto dopiero dla pseudosymetrycznych inhibitorów opartych na strukturze kwasów bis(α -aminoalkano)fosfinowych. Jak ujawniły badania struktury w stanie krystalicznym, ugrupowania fosfinowe takich związków oddziałują z każdą katalityczną resztą boczną kwasu asparaginowego, tworząc krótkie wiązanie wodorowe [247]. Interakcje takie zachodzą preferencyjnie dla uprotonowanej, niezjonizowanej formy kwasu fosfinowego. Dlatego aktywność inhibitorowa tego typu pseudopeptydów wykazuje silną zależność od pH, zwiększając się istotnie przy wzroście kwasowości buforu pomiarowe-



Rys. 23. Przykłady estrów fenylowych pseudopeptydów fosfonamidowych (**170**) oraz fosfinowych (**171**) jako inhibitorów chymotrypsyny

Fig. 23. Examples of pseudopeptide phosphonamidate (**170**) and phosphinate (**171**) phenyl esters as inhibitors of chymotrypsin

go [245–248]. Przekształcenie fosfinianu (**169**, R = OH) w obojętny fosfinamid (**169**, R = NH₂) skutkuje także znacznym zwiększeniem aktywności antywirusowej w testach *in vivo* prowadzonych na kulturach komórkowych [248].

Fosfonamidowe oraz fosfinowe analogi peptydów nie znalazły do tej pory zastosowania jako inhibitory enzymów proteolitycznych z grupy cysteinowych, a jedynie marginalna uwaga została im poświęcona w kontekście regulowania aktywności proteaz serynowych. Przykłady takich inhibitorów chymotrypsyny (związki **170** oraz **171**) [169, 251] przedstawiono na rysunku 23.

Warto zwrócić uwagę, że związki **170** oraz **171** zawierają w swoim składzie fragment estru fenylowego, który nieodwracalnie fosfonyluje w reakcji transestryfikacji katalityczną resztę hydroksylową seryny w centrum aktywnym. W istocie rzeczy stanowią więc modyfikację najbardziej znanych, kowalencyjnie wiążących się fosforoorganicznych inhibitorów tej grupy enzymów – peptydylofosfonianów difenylowych (pochodnych aminokwasów lub ich krótkich peptydów zawierających C-terminalną resztę fosfonoestrową) [188, 189, 252].

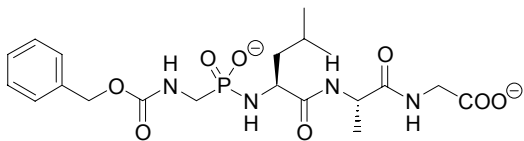
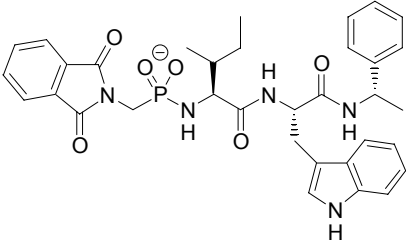
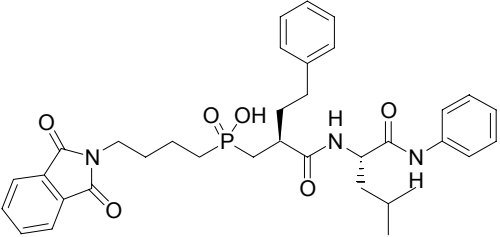
W podsumowaniu omawiającym zastosowanie fosfonamidowych i fosfinowych ligandów o budowie pseudopeptydów należy stwierdzić, że zaprezentowane przykłady nie wyczerpują wszystkich doniesień literaturowych dotyczących ich użycia do regulowania aktywności biologicznej odpowiednich receptorów. Rozciągają się one bowiem także na inne grupy enzymów, takich jak: hydrolazy (inne niż proteazy), transferazy, ligazy czy liazы [58, 253–256] (reprezentatywne przeglądy literaturowe po roku 2000).

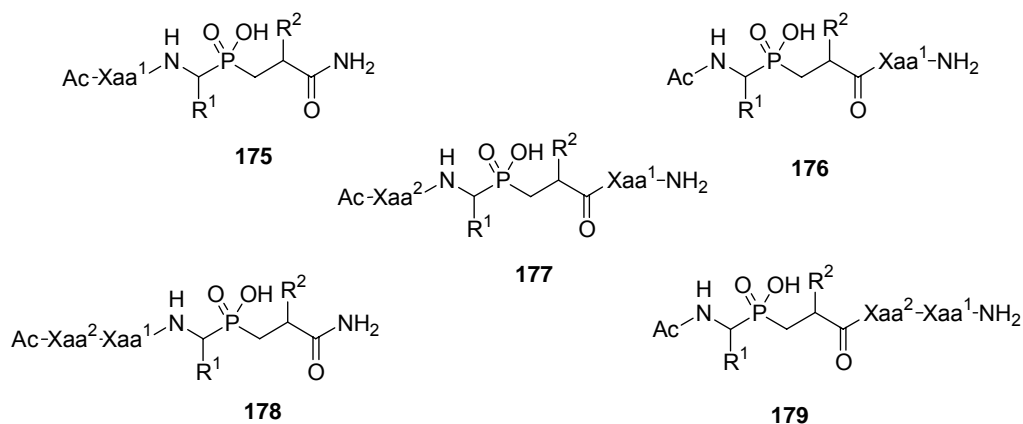
5.1. Inhibitory metaloproteinaz matriksowych

Metaloproteinazy matriksowe (matryksyny, MMP, ang. *matrix metalloproteinases*) to grupa proteolitycznych enzymów cynkozależnych, w skład której wchodzi: kolagenazy (1 – MMP-1, 2 – MMP-8, 3 – MMP-13), żelatynazy (A – MMP-2, B – MMP-9), stromelizyny (1 – MMP-3, 2 – MMP-10, 3 – MMP-11), matrylizyny (1 – MMP-7), transmembranowe MMP (MT-MMP, ang. *membrane type-MMP*) i inne (w nawiasach podano najbardziej reprezentatywne przykłady) [257, 258]. Dwadzieścia trzy takie enzymy zidentyfikowano w organizmie człowieka. Metaloproteinazy matriksowe to zróżnicowane pod względem budowy, wielodomenowe enzymy. Jednym z wyznaczników ich klasyfikacji jest ścisła homologia sekwencyjna dotycząca fragmentu polipeptydowego wiążącego atom cynku w miejscu aktywnym. Drugim podstawowym wyróżnikiem MMP jest unikatowy sposób aktywacji (tzw. *cysteine switch*) polegający na hydrolizie konserwatywnego cysteinowego fragmentu proenzymów, który w latentnej formie dodatkowo koordynuje atom cynku, zamykając w ten sposób dostęp do centrum aktywnego [257, 258]. Enzymy te uczestniczą w kompleksowym procesie hydrolizy wszystkich składników matriks pozakomórkowego – złożonego zbioru makrocząsteczek tworzącego strukturalne i funkcjonalne otoczenie komórkowe. W ten sposób MMP odgrywają podstawową rolę w wielu procesach biologicznych polegających na remodelowaniu tkanek, takich jak: embriogeneza – powstawanie

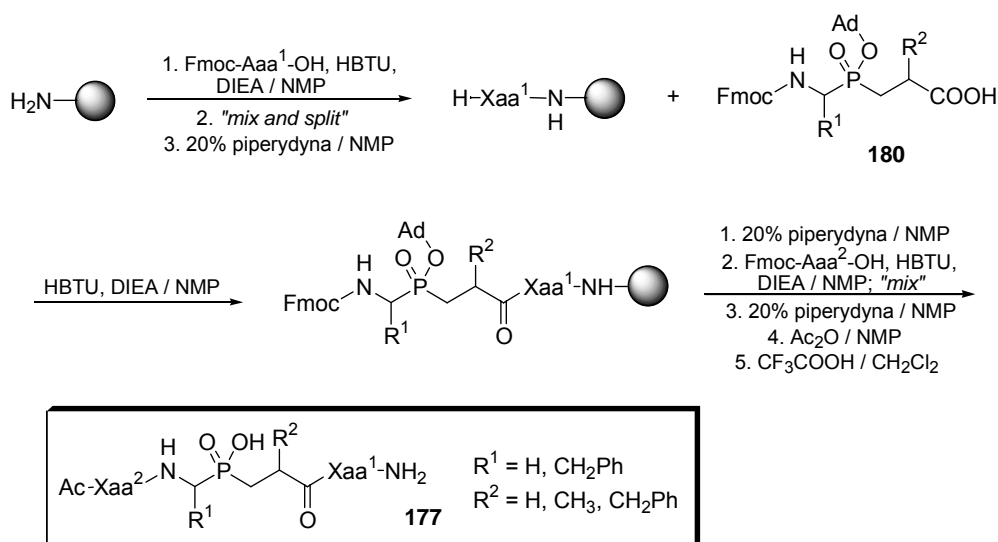
i rozwój zarodka, angiogeneza – tworzenie naczyń krwionośnych, gojenie ran i inne [257–260]. W warunkach fizjologicznych aktywność matryksyn jest wielostopniowo i bardzo ściśle regulowana, zarówno na poziomie translacji, jak i aktywacji zymogenów oraz inhibicji aktywnych form przez endogenne inhibitory (TIMP, ang. *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*). Utrata tej kontroli skutkuje nadekspresją MMP, która została skojarzona z wieloma stanami patologicznymi, takimi jak: zapalenie stawów, arterioskleroza, chroniczne owrzodzenie, a przede wszystkim choroby nowotworowe [260-264]. Dotyczy to zarówno wzrostu i ukrwienia pierwotnych ognisk nowotworowych, jak i bliskiego i dalekiego przerzutowania złośliwych form (metastaza). Regulacja aktywności metaloproteaz matryksowych przez odpowiednie inhibitory została określona jako jeden z podstawowych celów w terapii przeciwnowotworowej [13–15, 265–270]. Najnowszym postępow w tej dziedzinie kompleksowo poświęcony został także aktualny numer czasopisma *Biochemie: Matrix metalloproteinases and cancer. Novel perspectives in the role and control of matrix metalloproteinases in tumor progression*. (*Biochemie* **2005**, 87(3–4), 241–402).

Tabela 9. Przykłady fosfonamidowych oraz fosfinowych inhibitorów metaloproteaz matryksowych
Table 9. Examples of phosphonamidate and phosphinate inhibitors of matrix metalloproteinases

Inhibitor	K_i	Lit.
<p>172</p> <p>Cbz-GlyP[NH]Leu-Ala-Gly-OH</p> 	14 000 nM (MMP-8)	[167]
<p>173</p> <p>Pht-GlyP[NH]Ile-Trp-NHCH(Me)Ph</p> 	20 nM (MMP-8)	[271]
<p>174</p> 	20 nM (MMP-2) 1,4 nM (MMP-3)	[274]



Rys. 24. Ogólne struktury bibliotek kombinatorycznych zaprojektowanych do badań inhibicji stromelizyny 3 ($R^1 = \text{H, Bzl}$; $R^2 = \text{H, CH}_3, \text{Bzl}$; Xaa¹, Xaa² – zrandomizowane mieszaniny 20 reszt aminokwasowych)
 Fig. 24. General structures of combinatorial libraries designed for inhibition of stromelysin 3 ($R^1 = \text{H, Bzl}$; $R^2 = \text{H, CH}_3, \text{Bzl}$; Xaa¹, Xaa² – randomised mixtures of 20 amino acid residues)



Schemat 26. Przykładowa procedura syntetyczna dla biblioteki typu 177 (Aaa¹, Aaa² – reszta określonego aminokwasu; Xaa¹, Xaa² – zrandomizowane mieszaniny 20 reszt aminokwasowych)

Scheme 26. Example of synthetic procedure for a combinatorial library 177 (Aaa¹, Aaa² – the amino acid residue, Xaa¹, Xaa² – randomised mixtures of 20 amino acid residues)

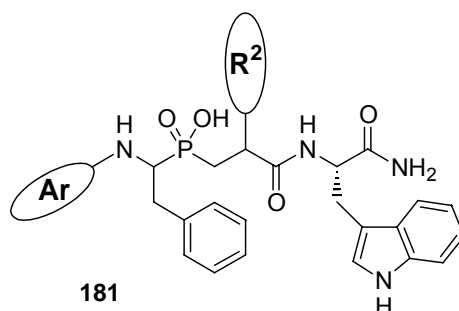
Pierwsze doniesienia literaturowe na temat inhibicji MMP przez fosforowe analogi peptydów pochodzą z przełomu lat osiemdziesiątych oraz dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku i dotyczą kolagenaz (formy występujące u ssaków, enzymy bakteryjne omówiono oddzielnie we wstępie do rozdziału 5, tabela 7) [167, 271, 272]. Cytowane prace reprezen-

tują charakterystyczne podejście stosowane przy opracowaniu tego typu związków, a mianowicie zastąpienie hydrolizowanego wiązania amidowego we fragmencie substratu (kolagenu) przez ugrupowanie fosfonamidowe (związki **172** i **173**, tabela 9).

Interesujące rezultaty tych [271] i kolejnych badań prowadzonych w laboratorium firmy Merck [273, 274], a dotyczących także fosfinopeptydów oraz innych matryksyn (MMP-2, MMP-3) ujawniły pewne ogólne cechy wymagane do efektywnego hamowania aktywności przedstawicieli tej grupy enzymów. Syntetyczne inhibitory powinny mieć wysoce hydrofobowy charakter sekwencji z chronionymi *N*- oraz *C*-końcem, a także zawierać rozbudowany podstawnik $P1'$. Co znamienne, porównanie potencji labilnych hydrolytycznie analogów fosfonamidowych oraz stabilnych fosfinowych tym razem bardzo zdecydowanie przemawiało na korzyść tych ostatnich [271, 274]. Stwierdzono ponadto, że niezwykle trudno jest osiągnąć selektywność oddziaływań względem różnych przedstawicieli tej rodziny enzymów. Przykłady fosforoorganicznych inhibitorów **172–174** opracowanych w tym początkowym okresie badań zaprezentowano w tabeli 9.

Na tym etapie rozwoju tematyki fosforoorganicznych inhibitorów MMP podjęto próby zastosowania syntezy kombinatorycznej w celu znalezienia aktywnych oraz selektywnych fosfinopeptydowych inhibitorów tych metaloproteaz, ze szczególnym uwzględnieniem stromelizyny 3 (MMP-11) [275]. Wyraźnie zwiększoną ekspresję tego enzymu odkryto w komórkach macierzowych w przypadkach raka piersi u kobiet [276]. Badania nad tym tematem zostały podjęte przez autora w trakcie stażu podoktorskiego w Zespole dr Dive (CEA Saclay, Francja). Do rozwiązania postawionego problemu użyto opracowanych wówczas w tym laboratorium, odpowiednich fosfinowych bloków budulcowych kompatybilnych z metodami chemii kombinatorycznej peptydów (patrz rozdz. 4) [79]. Zaplanowano i przeprowadzono syntezę kilku typów bibliotek tri- oraz tetrapeptydów o strukturach ogólnych **175–179** (rys. 24) na podstawie dostępnych analogów **180** ($R^1 = H, Bzl$; $R^2 = H, CH_3, Bzl$, schemat 26). Na schemacie 26 przedstawiono także przykładową (dla bibliotek kombinatorycznych o strukturze ogólnej **177**) zastosowaną procedurę syntetyczną [277].

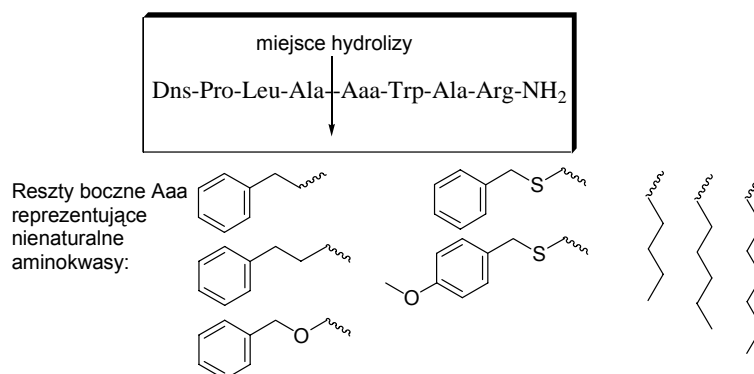
Syntezy przeprowadzono na polimerowym stałym podłożu Rinka typu amidowego według strategii Fmoc w automatycznym synteźatorze kombinatorycznym Advanced ChemTech 357. Aktywacja *C*-końcowej grupy karboksylowej do odpowiedniego estru benzotriazolu następowała z użyciem HBTU. Elongację pseudopeptydów prowadzono w dwudziestu niezależnych reaktorach, stosując dziewiętnaście pochodnych naturalnych aminokwasów, a cysteinę zastępowano norwaliną (reszty aminokwasów reprezentowane są na rysunku 24 oraz na schemacie 26 następującymi akronimami: Aaa – reszta pojedynczego aminokwasu oraz Xaa – zrandomizowana mieszanina dwudziestu reszt aminokwasowych). Do tworzenia bibliotek kombinatorycznych zastosowano standardową metodę „mieszaj i dziel” (ang. *mix and split*). Otrzymano kilka typów bibliotek zawierających ugrupowanie fosfinowe w różnych pozycjach polipeptydów. Każdy ze zbiorów tripeptydowych **175**, **176** składał się z 20 składników, natomiast tetrapeptydowe odpowiedniki **177–179** zawierały po 400 indywidualnych związków. Równomierną dystrybucję składników potwierdziły odpowiednie jakościowe i ilościowe analizy składu aminokwasów.



Rys. 25. Wstępna struktura wiodąca inhibitora stromelizyny 3 otrzymana na podstawie wyników testowania aktywności i dekonwolucji bibliotek kombinatorycznych fosfinopeptydów **175–179** (R^2 , Ar – fragmenty struktury inhibitora do dalszej optymalizacji)
 Fig. 25. Preliminary lead structure of the stromelysin 3 inhibitor obtained based on the results of the activity tests and recursive deconvolution of combinatorial libraries of phosphinic peptides **175–179** (R^2 , Ar – structural fragments for further optimisation)

Przeprowadzone testy aktywności otrzymanych bibliotek względem stromelizyny 3 nie przyniosły spektakularnych rezultatów. Mieszaniny **175–179** okazały się umiarkowanie aktywne z mikromolarnymi wartościami stałych K_i nie różniącymi się istotnie od siebie. Ewidentnie, nie osiągnięto specyficznych oddziaływań z receptorem. Rozwiązywanie bibliotek kombinatorycznych, tzw. dekonwolucja (ang. *recursive deconvolution*) przyniosło więc jedynie wstępną strukturę wiodącą **181** przedstawioną schematycznie na rysunku 25. Ścisłą preferencję wykazano tylko dla podstawnika $P2'$, którym okazała się reszta boczna tryptofanu. Oczywiście stała się konieczność optymalizacji pozycji $P1'$ (podstawnik R^2), tj. reszty najtrudniejszej do randomizacji (konstrukcja bloku budulcowego w każdym przypadku odbywa się *de novo*, patrz rozdz. 4) [79]. Wprowadzenie grup blokujących innych niż acetylowa pokazało natomiast znaczne możliwości zwiększenia potencji związków przez modyfikację *N*-końca inhibitora odpowiednio dobraną resztą aromatyczną (Ar).

Ze względu na umiarkowany sukces osiągnięty z użyciem chemii kombinatorycznej, zadanie dalszej optymalizacji struktury wiodącej inhibitora stromelizyny 3 **181** zostało zaadresowane do metod modelowania molekularnego. U podstaw tego procesu leży sukcesywne rozwiązywanie struktur krystalicznych MMP, począwszy od domeny katalitycznej kolagenazy 1 opublikowanej przez laboratorium firmy Glaxo w 1994 roku [278]. Obecnie jest znanych kilkadziesiąt takich struktur trójwymiarowych, przede wszystkim w kompleksach z odpowiednimi inhibitorami [270, 279]. Badania te ujawniły zaskakującą architekturę wnęki wiążącej $S1'$ mającej kształt długiego „tunelu” zdolnego akceptować rozbudowane reszty alkilowe, aryloalkilowe i heteroaryloalkilowe. Minimalne mutacje pomiędzy różnymi przedstawicielami matryksyn w tym fragmencie sekwencji pozwoliły przewidzieć podobną sytuację dla enzymów o nieznannej strukturze trójwymiarowej. W przypadku stromelizyny 3 oraz MT1-MMP dodatkowo potwierdzono to, opracowując serię syntetycznych, fluorogenicznych substratów opartych na resztach nienaturalnych aminokwasów w pozycji $P1'$ (rys. 26) [280].



Rys. 26. Struktura fluorogenicznych substratów stromelizyny 3 oraz MT1-MMP

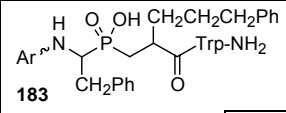
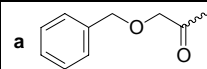
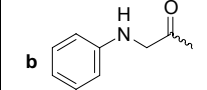
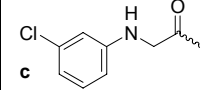
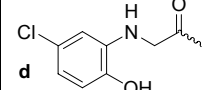
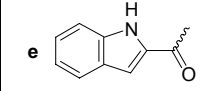
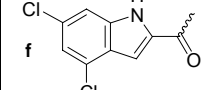
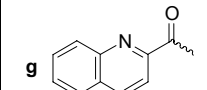
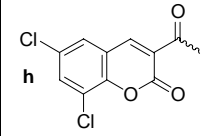
Fig. 26. Structures of fluorogenic substrates of stromelysin 3 and MT1-MMP

Tabela 10. Inhibicja wybranych metaloproteinaz matriksowych poprzez fosfotripeptydy o wzorze ogólnym Cbz-PheP[CH₂]Aaa-Trp-NH₂ – optymalizacja podstawnika P1'

Table 10. Inhibition of selected matrix metalloproteinases by phosphinic tripeptides of general formula Cbz-PheP[CH₂]Aaa-Trp-NH₂ – optimisation of the P1' substituent

 182 R ²	K _i (nM) (lub % hamowania aktywności enzymu przy danym stężeniu inhibitora)						
	MMP-11 (Str-3)	MMP-2 (Gel-A)	MMP-9 (Gel-B)	MMP-14 (MT1-MMP)	MMP-1 (Col-1)	MMP-7 (Mat-1)	MMP-8 (Col-2)
a	9	275	110	660	10% (2 μM)	7% (2 μM)	45
b	5	20	10	105	23% (2 μM)	8% (2 μM)	2,5
c	33	145	70	580	5% (2 μM)	7% (2 μM)	4,3
d	16	85	55	545	9% (2 μM)	3% (2 μM)	20
e	2	6	3	22	13% (2 μM)	20% (2 μM)	0,7
f	74	330	675	1350	0% (5 μM)	1800	230
g	12	30	55	125	0% (2 μM)	2100	34
h	34	75	30	271	27% (2 μM)	4% (2 μM)	6

Tabela 11. Inhibicja wybranych metaloproteinaz matriksowych poprzez fosfotripeptydy o wzorze ogólnym Ar–PheP[CH₂]pPhe–Trp–NH₂ – optymalizacja podstawnika obejmującego fragment P2–P4 (pPhe – reszta analogu kwasu 2-amino-5-fenylpentanowego)
 Table 11. Inhibition of selected matrix metalloproteinases by phosphinic tripeptides of general formula Ar–PheP[CH₂]pPhe–Trp–NH₂ – optimisation of the P2–P4 substituent (pPhe – the residue of the analogue of 2-amino-5-phenylpentanoic acid)

 183 Ar	K _i (nM) (lub % hamowania aktywności enzymu przy danym stężeniu inhibitora)						
	MMP-11 (Str-3)	MMP-2 (Gel-A)	MMP-9 (Gel-B)	MMP-14 (MT1-MMP)	MMP-1 (Col-1)	MMP-7 (Mat-1)	MMP-8 (Col-2)
a 	5	8	10	40	43% (2 μM)	52% (2 μM)	2,5
b 	15	17	6	73	49% (2 μM)	28% (2 μM)	4,5
c 	3.8	9	6	45	77% (2 μM)	40% (2 μM)	4
d 	10	30	34	63	72% (2 μM)	65% (2 μM)	7,5
e 	1.5	10	8	41	53	605	1,5
f 	0.9	24	7	32	36	117	5
g 	4.2	19	13	60	340	370	5
h 	5	100	110	217	62% (2 μM)	52% (2 μM)	17
i Cbz–Ala	8	11	10	41	40% (2 μM)	33% (2 μM)	5,5
j Cbz–Leu	6	40	22	53	32% (2 μM)	45% (2 μM)	7

Związki zawierające bardzo rozbudowane reszty nienaturalnych aminokwasów w pozycji P1' okazały się być znacznie szybciej trawione niż posiadające leucynę czy fenyloalaninę. Szczególnie interesujący pod tym względem okazał się podstawnik *p*-metoksybenzylcysteiny, co dodatkowo zaowocowało opracowaniem analogu oktapeptydu Mca-Pro-Leu-Ala-Cys(*p*-MeOBzl)-Trp-Ala-Arg-Dap(Dnp)-NH₂ będącego obecnie handlowo dostępnym (Bachem) substratem MMP-11 oraz MMP-14 (Mca – reszta kwasu 7-metoksykumaryno-4-octowego; Dap(Dnp) – kwas 3-*N*-2,4-dinitrofenylo-2,3-diaminopropionowy).

Podobne reszty P1' zastosowano w badaniach zależności struktura–aktywność zmodyfikowanych inhibitorów opartych na związku wiodącym **181**, a wyniki przedstawiono w tabeli 10 [275]. Dla odpowiednich tripeptydów **182a–h** osiągnięto bardzo interesujące, nanomolarne wartości stałych inhibicji *K_i*; dla różnych MMP, w tym stromelizyny 3 oraz MT1-MMP. Analogicznie do substratów, resztą najefektywniej wiązaną okazała się grupa *p*-metoksybenzylotiometylowa (**182e**, R² = *p*-MeO-C₆H₄-CH₂SCH₂).

Przetestowano także serię związków **183a–j** zawierających różnorodne, zaprojektowane podstawniki aromatyczne stanowiące modyfikację *N*-końcowego fragmentu P2–P4 inhibitorów [275]. Jako konserwatywny podstawnik P1' wybrano resztę fenylopropylową. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 11.

Przedstawione wyniki badań struktura–aktywność pokazały wyraźnie, które fragmenty cząsteczki są odpowiedzialne za ich duże powinowactwo względem stromelizyny 3. Dużej aktywności sprzyja obecność rozbudowanego aryloalkilowego podstawnika P1', a dodatkowo preferowana jest obecność w nim heteroatomu. Istotna jest także obecność dużego, hydrofobowego, heteroaromatycznego fragmentu *N*-końcowego.

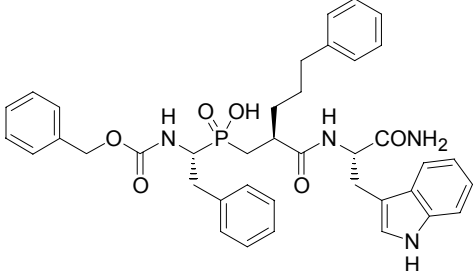
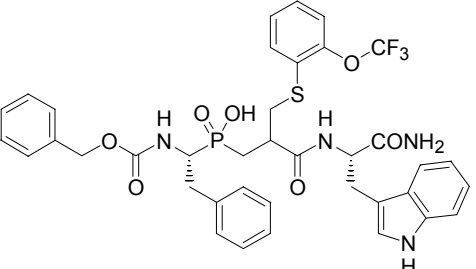
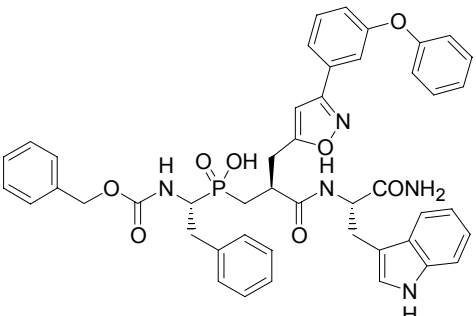
W kontekście selektywności inhibitorów osiągnięto spodziewane rezultaty. Jedynym czynnikiem dyskryminującym w tym względzie jest prawdopodobnie pojedyncza mutacja aminokwasu 214 (numeracja MMP-1) w obrębie sekwencji tworzącej kieszeń wiążącą S1'. Dla większości przedstawicieli MMP, w tym MMP-2, MMP-8, MMP-9 oraz MMP-14 jest to leucyna zawierający alifatyczny łańcuch boczny. W przypadku MMP-1 oraz MMP-7 są to natomiast odpowiednio: arginina oraz tyrozyna. Te nieco bardziej wydłużone reszty ograniczają głębokość wnęki wiążącej S1' i nie pozwalają na wiązanie wydłużonych podstawników. W ten sposób hamowanie ich aktywności przez związki **182**, **183** jest wyraźnie słabsze (patrz dane *K_i*, tabela 10 oraz 11). Dla stromelizyny 3 natomiast rozpatrywany aminokwas 214 w kanonicznej sekwencji to glutaminian o reszcie bocznej pośredniej wielkości względem wymienionych. Ponieważ nie jest znana struktura krystaliczna wolnego enzymu, postuluje się, że w tym przypadku następuje odpowiednia zmiana konformacyjna ułatwiająca przyjmowanie odpowiednio dużych podstawników ligandów [92]. Preferowana jest w nich obecność heteroatomów tworzących odpowiednie wiązania wodorowe z grupą amidową glutaminianu.

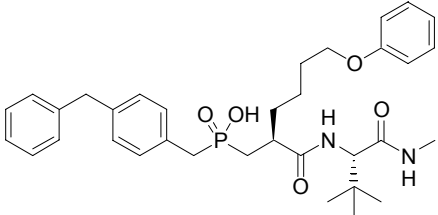
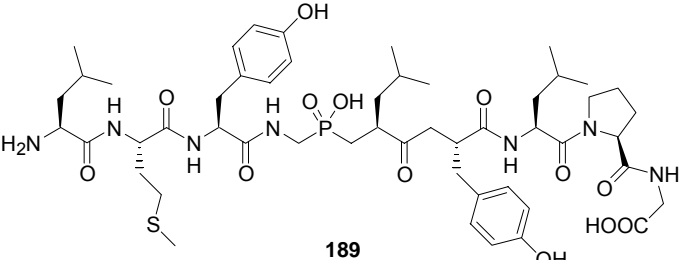
Największym sukcesem wykonanego projektu okazało się opracowanie związku **184** – struktury wiodącej w dalszych studiach nad inhibicją metaloproteinaz matriksowych prowadzonych w laboratorium dr Dive oraz prof. Yiotakisa. Związek **184**, oznaczany w literaturze akronimem RXP03, posłużył przede wszystkim jako zdolny do tworzenia krystalicznych kompleksów ze stromelizyną 3. Rozwiązanie struktury trójwymiarowej takiego kompleksu

pokazało charakterystyczny dla analogu stanu przejściowego sposób wiązania inhibitora w centrum aktywnym enzymu [86]. Na podstawie struktury związku **184** prowadzono także dalszą optymalizację podstawnika P1' (również metodami chemii kombinatorycznej, patrz rozdz. 4) ukierunkowaną na zwiększenie selektywności interakcji z poszczególnymi przedstawicielami rodziny MMP, szczególnie przez wprowadzenie odpowiednich heteroatomów [213–215]. Wyniki tych badań, na tle innych literaturowych osiągnięć [59, 281–284] dotyczących analogicznej tematyki, przedstawiono dodatkowo w tabeli 12.

Tabela 12. Literaturowe przykłady selektywnych inhibitorów względem różnorodnych przedstawicieli metaloproteinaz matriksowych – porównanie do RXP03

Table 12. Literature examples of inhibitors selective for various representatives of matrix metalloproteinases – comparison to RXP03

Inhibitor	Aktywność inhibitorowa: K_i lub IC_{50} (badany enzym)	Lit.
184 	$K_i = 20$ nM (MMP-2) $K_i = 2,5$ nM (MMP-8) $K_i = 10$ nM (MMP-9) $K_i = 5$ nM (MMP-11) $K_i = 105$ nM (MMP-14) $K_i > 2000$ nM (MMP-1, MMP-7)	[275]
185 	$K_i = 148\ 000$ nM (MMP-9) $K_i = 410$ nM (MMP-11) $K_i = 30\ 000$ nM (MMP-14) $K_i = 200\ 000$ nM (MMP-2, MMP-8, MMP-13)	[214]
186 	$K_i = 28$ nM (MMP-13) $K_i = 5100$ nM (MMP-14)	[215]

 <p>188</p>	<p>$IC_{50} > 30\ 000\ \text{nM}$ (MMP-1)</p> <p>$IC_{50} = 30\ \text{nM}$ (MMP-13)</p>	[281]
<p>H–Leu–Met–Tyr–Gly[CH₂]Leu–Tyr–Leu–Pro–Gly–OH</p>  <p>189</p>	<p>$K_i = 9,4\ \text{nM}$ (MMP-7)</p> <p>$K_i = 9000\ \text{nM}$ (MMP-9)</p> <p>$K_i = 8\ \text{nM}$ (MMP-12)</p> <p>$K_i = 2300\ \text{nM}$ (MMP-13)</p> <p>$K_i = 195\ \text{nM}$ (MMP-14)</p>	[59, 283]

W podsumowaniu warto zaznaczyć, że fosfinopeptydy to tylko jedna z czterech głównych grup związków badanych jako inhibitory metaloproteinaz matriksowych pod kątem przydatności w terapii przeciwnowotworowej. Pozostałe to tiole, kwasy karboksylowe oraz kwasy hydroksamowe. Mimo że związki fosforoorganiczne wykazują wiele zalet w porównaniu z pozostałymi typami inhibitorów (patrz dyskusja w rozdz. 1.2), to perspektywy ich terapeutycznego zastosowania są odległe. Jest to przede wszystkim spowodowane ich skomplikowaną syntezą. Najdalej zaawansowane w badaniach klinicznych były inhibitory hydroksamowe (np. batimastat – BB-94 oraz marimastat opracowane przez firmę British Biotech). Niestety przy bezpośrednim podawaniu chorym zawiodły one jako potencjalne leki [267, 269, 270]. Prawdopodobną przyczyną tego jest niezwykle złożony układ, z jakim ma się do czynienia w procesach fizjologicznego i patologicznego remodelowania tkanek. MMP hydrolizują bowiem nie tylko strukturalne składniki matriks, ale także cały kompleks receptorów, cytokin i chemokin, wpływając na regulację tych procesów. Bez dalszego ich rozpoznania nie można niestety oczekiwać szybkiego opracowania leków przeciwnowotworowych o aktywności opartej na inhibicji metaloproteaz matriksowych.

5.2. Racjonalnie projektowane fosforoorganiczne inhibitory leucyloaminopeptydazy

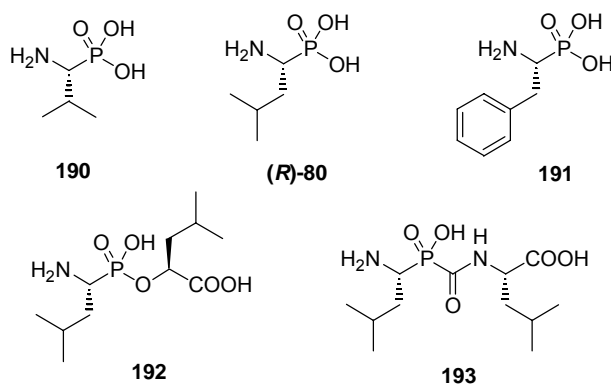
Cytozolowa leucyloaminopeptydaza (LAP, EC 3.4.11.1) to jedna z pierwszych odkrytych i najlepiej poznanych aminopeptydaz, biorąc pod uwagę sekwencję, strukturę i mechanizm działania [285–289]. LAP jest egzopeptydazą, która katalizuje hydrolizę *N*-końcowego aminokwasu w substratach oligopeptydowych, a jej specyficzność jest

ukierunkowana na hydrofobowe reszty alifatycznych i aromatycznych aminokwasów, takich jak leucyna czy fenyloalanina. Co charakterystyczne, aktywność tego enzymu jest zależna od dwóch kationów cynku (lub innego metalu) obecnych w miejscu aktywnym. Jak ujawniła trójwymiarowa struktura wolnej formy LAP z soczewki wołowej [288] jony metalu są głównie koordynowane przez odpowiednie grupy karboksylowe reszty bocznej odpowiednich kwasów asparaginowego i glutaminowego. W natywnym enzymie jony Zn^{2+} znajdują się w odległości około 3 Å od siebie i są połączone mostkiem, utworzonym przez cząsteczkę wody.

Podobnie jak inne aminopeptydazy LAP odgrywa kluczową rolę w fizjologicznych procesach modyfikacji białek, aktywacji oraz degradacji hormonalnych i niehormonalnych peptydów. Na przykład, zwiększony poziom leucyloaminopeptydazy obserwowano w stanach patologicznych takich, jak: choroby nowotworowe, białaczka szpikowa, katarakta oka czy wczesne stadia infekcji wirusem HIV [290–296], a potencjalne inhibitory tego enzymu budzą zainteresowanie przede wszystkim jako ewentualne środki przeciwnowotworowe.

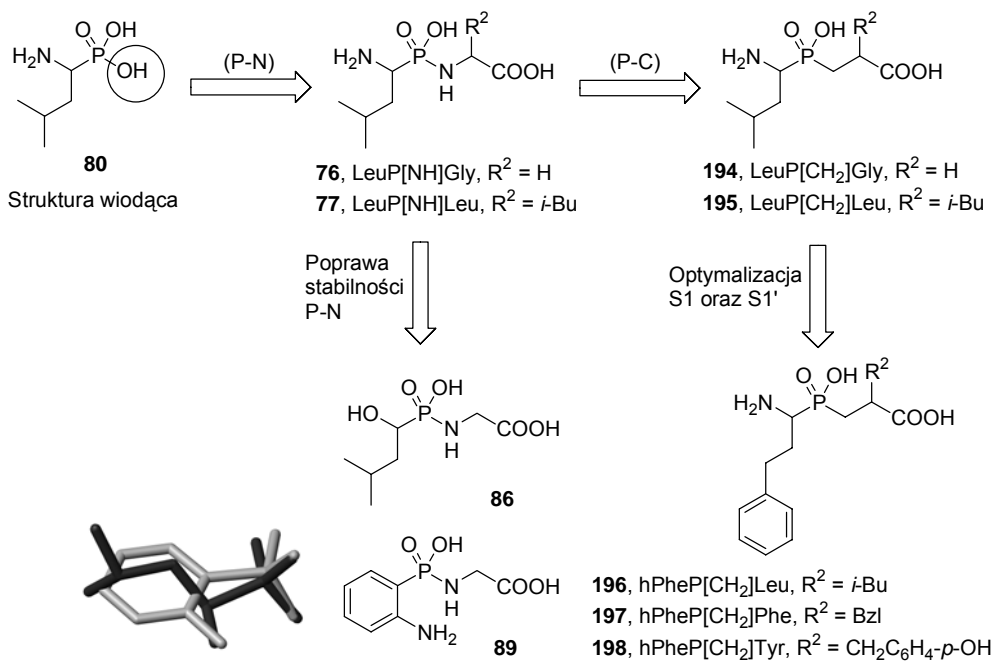
Najbardziej efektywne inhibitory leucyloaminopeptydazy to produkty naturalne takie jak: bestatyna – [(2*S*,3*R*)-3-amino-2-hydrokso-4-fenylobutanoilo]-(*S*)-leucyna oraz amastatyna – kwas [(2*S*,3*R*)-3-amino-2-hydrokso-5-metyloheksanoilo]-(*S*)-walilo-(*S*)-walilo--(*S*)-asparaginowy. Są to wolno wiążące peptydowe inhibitory uważane za analogi stanu przejściowego hydrolizy wiązania amidowego [297–299]. Charakterystycznie koordynują one obecny w centrum aktywnym Zn^{489} poprzez atom azotu *N*-końcowej grupy aminowej oraz atom tlenu grupy hydroksylowej [300–302]. Ten ostatni, którego pozycja jest podobna do pozycji atomu tlenu cząsteczki wody w strukturze natywnej LAP, oddziałuje również z Zn^{488} . Otrzymano także wiele inhibitorów syntetycznych [303]. Struktura większości z nich jest oparta na analogii do leucyny, w której grupę karboksylową zastąpiono inną, odpowiednio silnie oddziałującą z atomem cynku, np. aldehydową, tiolową, chlorometyloketonową, kwasu borowego czy hydroksamowego. Podobne badania prowadzono również, modyfikując bestatynę i amastatynę jako substancje wiodące.

Związki fosforoorganiczne okazały się interesującymi inhibitorami LAP. Enancjomery (*R*) fosfonowych analogów hydrofobowych aminokwasów (ValP, **190**, $K_i = 0,15 \mu\text{M}$; LeuP, **80**, $K_i = 0,23 \mu\text{M}$; PheP, **191**, $K_i = 0,42 \mu\text{M}$, rys. 27) wykazywały silną kompetycyjną inhibicję o kinetyce wolno wiążącej [122, 304]. Inne pochodne, takie jak: monoestry fosfonowe lub kwasy *H*-fosfinowe, *P*-metylofosfinowe czy *P*-chlorometylofosfinowe wykazywały już znacznie mniejszą potencję. Zaskakująco, bardziej rozbudowane pseudo-peptydowe pochodne także nie osiągnęły aktywności wykazywanej przez najprostsze aminokwasowe analogi (**R**)-**80**, **190** oraz **191**. Przykładowo, fosfonodepsidipeptydy, np. H–LeuP[O]Leu–OH **192** czy H–PheP[O]Leu–OH wykazywały umiarkowane wartości K_i wynoszące odpowiednio 58 μM oraz 340 μM [122]. Podobnie aktywny okazał się związek oparty na strukturze bestatyny **193**, w którym fragment hydroksymetinowy (CH–OH) zastąpiono tetraedryczną grupą P(O)OH ($K_i = 56 \mu\text{M}$, rys. 27).



Rys. 27. Przykłady syntetycznych, fosforoorganicznych inhibitorów leucyloaminopeptydazy

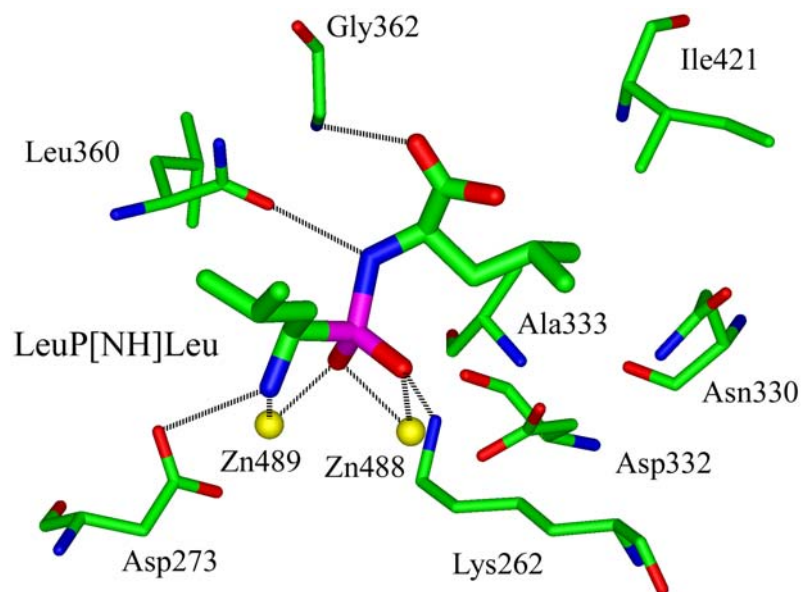
Fig. 27. Examples of synthetic phosphoroorganic inhibitors of leucine aminopeptidase

Rys. 28. Struktury fosfonamidowych oraz fosfinowych inhibitorów leucyloaminopeptydazy zaprojektowanych metodami modelowania molekularnego. Obok związku **89** nałożenie fragmentów P1 inhibitorów zawierających resztę leucyny (kolor czarny) oraz kwasu 2-aminobenzenofosfonowego (kolor szary, opis w tekście)Fig. 28. Structures of phosphonamidate and phosphinate leucine aminopeptidase inhibitors designed by molecular modelling methods. On the left to **89**, superimposition of the P1 fragments of the inhibitors containing the residues of leucine (in black) and 2-aminobenzenephosphonic acid (in grey, description in the text)

Mala aktywność pseudopeptydów **192**, **193** jest prawdopodobnie główną przyczyną tego, że w przypadku leucyloaminopeptydazy nie testowano dotychczas aktywności analogów fosfonamidowych oraz fosfinowych. Co ciekawe, właśnie takie związki okazały się potencjalnie niezwykle interesującymi inhibitorami LAP, racjonalnie zaprojektowanymi w naszym Zakładzie (dr J. Grembecka) z użyciem wspomaganých komputerowo metod modelowania molekularnego. Wykorzystano do tego celu program LUDI [305–308] z pakietu Insight firmy Accelrys na podstawie dostępnej trójwymiarowej struktury krystalicznej kompleksu LAP z fosfonowym analogiem leucyny (**R**)-**80** [309]. Program ten umożliwia dobór nowych fragmentów strukturalnych cząsteczki wiodącej (projektowanych *de novo* lub pochodzących z biblioteki LUDI), komplementarnych sterycznie i elektrostatycznie względem receptora, np. kieszeni wiążących enzymu, a następnie teoretyczną ocenę i optymalizację oddziaływań ligand–receptor. W ciągu ostatnich lat zastosowanie tej metody w naszym Zespole przyniosło opracowanie nowych inhibitorów leucyloaminopeptydazy oraz syntetazy glutaminy [310–314].

Zaprojektowane struktury fosfonamidowych oraz fosfinowych pseudopeptydów otrzymano przez formalne zastąpienie jednej z grup OH w reszcie fosfonowej związku wiodącego (**R**)-**80** fragmentem komplementarnym względem kieszeni wiążącej S1' enzymu. Ogólną strategię projektowania inhibitorów przedstawiono na rysunku 28 [131, 315, 316].

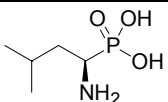
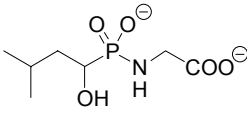
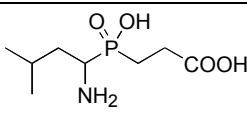
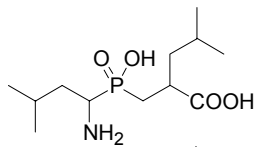
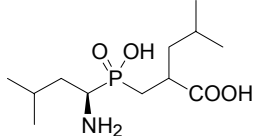
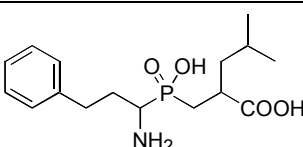
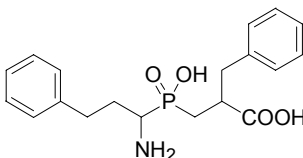
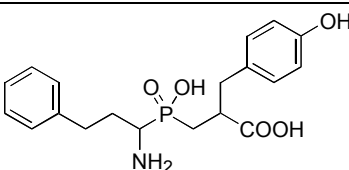
W pierwszym etapie syntezy skoncentrowano się na fosfonamidowych pochodnych dipeptydów: H–LeuP[NH]Gly–OH (**76**) oraz H–LeuP[NH]Leu–OH (**77**), związkach



Rys. 29. Znaleziony na drodze modelowania molekularnego sposób wiązania H–LeuP[NH]Leu–OH (**77**) w miejscu aktywnym leucyloaminopeptydazy (na podstawie struktury krystalicznej LAP – (**R**)-**80**)

Fig. 29. The binding mode of H–LeuP[NH]Leu–OH (**77**) in the active site of leucine aminopeptidase (found by molecular modelling based on the crystal structure of LAP – (**R**)-**80**)

Tabela 13. Inhibicja cytozolowej (LAP) oraz mikrosomalnej leucyloaminopeptydazy (APM) poprzez fosforoorganiczne inhibitory – analogi dipeptydów, w porównaniu do związku wiodącego – (R)-LeuP (NW – nie wyznaczano K_i)
 Table 13. Inhibition of cytosolic (LAP) and microsomal leucine aminopeptidase (APM) by phosphoroorganic inhibitors – the dipeptide analogues compared to the lead compound – (R)-LeuP (NW – K_i not estimated)

Inhibitor	K_i (LAP)	K_i (APM)
(R)-LeuP	230 nM [122]	55000 nM
(R)-80 		
$^{10}\text{H-LeuP}[\text{NH}]\text{Gly-OH}$	4880 nM	NW
86 		
H-LeuP[CH ₂]Gly-OH	330 nM	1415 nM
194 		
H-LeuP[CH ₂]Leu-OH	110 nM	NW
195 		
(R)-H-LeuP[CH ₂]Leu-OH	65 nM	1015 nM
(R)-195 		
H-hPheP[CH ₂]Leu-OH	74 nM	1006 nM
196 		
H-hPheP[CH ₂]Phe-OH	66 nM	276 nM
197 		
H-hPheP[CH ₂]Tyr-OH	67 nM	36 nM
198 		

puszczalny sposób oddziaływania pochodnej leucyloleucyny **77** z enzymem przedstawiono na rysunku 29 [131]. Warto zwrócić uwagę na charakterystyczne interakcje grupy aminowej oraz atomów tlenu grupy fosfonamidowej kompleksujących obydwie katalityczne atomy cynku. Ważne jest także wiązanie wodorowe NH fosfonamidu z C=O Leu360 odtwarzające to, które jest obecne w hydrolizowanym substracie.

Synteze związków fosfonamidowych oraz badanie ich stabilności hydrolitycznej przedstawiono odpowiednio w rozdziałach 3.1 oraz 3.3. Zgodnie z ich wynikami, całkowicie odblokowane analogi **76**, **77** okazały się zaskakująco nietrwale, rozpadając się w roztworach wodnych, gdy pH było poniżej 12 [131, 132]. Wykluczyło to możliwość ich przetestowania w badaniach hamowania aktywności LAP (pH dla odpowiednich testów kinetycznych wynosi 8,5). W celu ominięcia tego niekorzystnego zjawiska zaprojektowano kilka możliwych sposobów modyfikacji tych związków. Pierwszy wariant zmian opierał się na stwierdzeniu, że brak odporności fosfonamidów na hydrolizę jest ściśle związany z zasadowością *N*-terminalnej grupy aminowej katalizującej przebieg procesu (patrz rozdz. 3.3) [132]. Założono więc jej „zastąpienie” inną resztą, np. grupą hydroksylową i otrzymanie związku **86** [131] lub aromatyczną grupą aminową o zmniejszonej zasadowości, co prowadziło do związku **89** [193, 217]. W drugim przypadku fragment kwasu 2-aminobenzenofosfonowego powinien wiązać się we fragmencie S1 enzymu w sposób zbliżony do leucyny (rys. 28). Udało się zrealizować te zamierzenia – otrzymano obie takie pochodne: **86** i **89**, udowodniono, że są one całkowicie stabilne dla pH = 8,5 (patrz rozdz. 3.3) i poddano je testom *in vitro* [131, 193, 217]. Drugą generalną możliwością zmian poprawiających trwałość inhibitorów było zastąpienie labilnego wiązania P–N ugrupowaniem fosfinowym [131]. Otrzymano w ten sposób pochodne **194**, **195** (syntezy opisano w rozdz. 4.2) wykazujące bardzo interesujące powinowactwo względem LAP (tabela 13). Rozszerzając badania dodatkowo zaprojektowano i otrzymano zmodyfikowane związki, zawierające resztę homofenyloalaniny [317] w pozycji P1 **196–198**, będące najbardziej aktywnymi fosforoorganicznymi inhibitorami tego enzymu znalezionymi dotychczas [131]. Wyniki hamowania aktywności leucyloaminopeptydazy poprzez te związki przedstawiono w tabeli 13. Dodatkowo zbadano selektywność ich działania względem aminoaminopeptydazy N (mikrosomalnej leucyloaminopeptydazy, APM, EC 3.4.11.2).

Fosfonamidy **86** oraz **89** okazały się mało interesującymi inhibitorami LAP. Związek **89** nie wykazywał żadnego efektu hamującego aktywność enzymu do stężenia 1,15 mM [193]. Hydroksylowa pochodna dipeptydu **86** była natomiast jedynie umiarkowanie efektywnym inhibitorem. Warto jednak zwrócić uwagę że, dzięki otrzymanemu wynikowi można było ocenić wkład wiązania fosfonamidowego do energii wiązania ligandu, porównując znane powinowactwa w parze ${}^{\text{H}^{\text{O}}}\text{LeuP} \rightarrow {}^{\text{H}^{\text{O}}}\text{LeuP}[\text{NH}]\text{Gly-OH}$ [131, 304]. W rezultacie szacunkowa wartość stałej K_i dla zaprojektowanego związku **76** (po przeniesieniu tego udziału na parę $\text{LeuP} \rightarrow \text{H-LeuP}[\text{NH}]\text{Gly-OH}$) powinna mieścić się w małych wartościach nanomolarnych. Wynik ten dodatkowo potwierdził użyteczność zastosowanej metody do projektowania i teoretycznego przewidywania aktywności inhibitorów LAP ($K_i = 46$ nM obliczony

z użyciem modułu LUDI). Koniecznym warunkiem aktywności okazała się też obecność w cząsteczce grupy aminowej o odpowiedniej zasadowości.

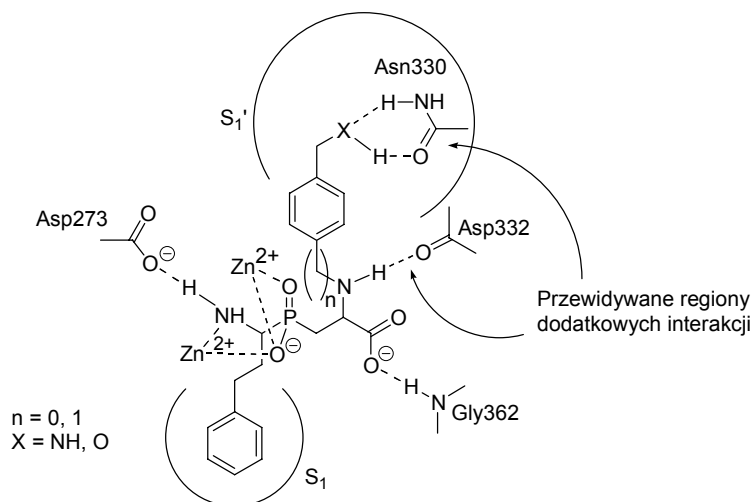
Najważniejszym osiągnięciem projektu okazało się natomiast opracowanie fosfinowych analogów zawierających resztę homofenyloalaniny w pozycji P1 **196–198**. Wykazały one silne powinowactwo do LAP (K_i w zakresie 66–74 nM dla mieszaniny czterech diastereoizomerów). Wspólnie z leucynalem ($K_i = 60$ nM) [318] są to najaktywniejsze syntetyczne inhibitory tego enzymu dotychczas otrzymane. Niewiele mniejszą potencję wykazuje H–LeuP[CH₂]Leu–OH **195**. Zastosowanie do jego syntezy enancjomerycznie czystego substratu o konfiguracji absolutnej (R) (względnej L) (**R**)-**48** i otrzymanie mieszaniny tylko dwóch diastereoizomerów (R)–H–LeuP[CH₂]Leu–OH (**R**)-**195** wskazuje na oczywistą preferencję enzymu względem inhibitorów o naturalnej konfiguracji aminokwasowej.

Uzyskane dane eksperymentalne dla H–LeuP[CH₂]Leu–OH **195**, obliczone teoretycznie dla H–LeuP[NH]Leu–OH **77** ($K_i = 5$ nM) [131] oraz dostępne w literaturze dla H–LeuP[O]Leu–OH **192** [122] wykazują zaskakującą analogię względem podobnych fosfonamidowych, fosfonowych oraz fosfinowych inhibitorów termolizyny **7**, **14** oraz **15** [62–66]. Różnice w ich aktywności mogą być więc prawdopodobnie wyjaśnione w zbliżony sposób w kontekście zrywania i tworzenia wiązań wodorowych w procesie desolvatacji ligandu i jego dokowania w miejscu katalitycznym enzymu (szczegółowa dyskusja przedstawiona została w rozdz. 1.1).

Interesujące wyniki uzyskano także rozpatrując selektywność opracowanych związków względem APM. O ile w przypadku LAP wyniki efekty uzyskuje się dla inhibitorów zawierających hydrofobowe, zarówno alifatyczne, jak i aromatyczne podstawniki P1', o tyle kieszeń wiążąca S1' APM silnie dyskryminuje te pierwsze. Właśnie dla tego typu pochodnych, tj. **195**, **196** osiągnięto największe współczynniki selektywności. Zaskakująco, dodatkowa obecność reszty hydroksylowej w rozpatrywanym fragmencie, tak jak dla analogu **198**, skutkuje wyjątkowo dużym jego powinowactwem do APM (tabela 13). Zostało to wyjaśnione tworzeniem specyficznych oddziaływań elektrostatycznych/wiązań wodorowych z boczną grupą karboksylową Glu413 tego enzymu obecnej w jego centrum aktywnym, którego kształt uzyskano w wyniku modelowania na podstawie jego homologii strukturalnej do hydrolazy leukotrienu [131]. W przypadku LAP podobne i potencjalnie możliwe wiązanie wodorowe z resztą amidową Asn330 kieszeni S1' ewidentnie nie ma miejsca. Dowodzi tego porównanie praktycznie jednakowej aktywności związków H–hPheP[CH₂]Phe–OH **197** oraz H–hPheP[CH₂]Tyr–OH **198**.

Prawdopodobną przyczyną tego, że grupa hydroksylowa obecna w związku H–hPheP[CH₂]Tyr–OH **198** nie tworzy specyficznych oddziaływań z grupą amidową Asn330 leucyloaminopeptydazy może być niekorzystna geometria takiego wiązania. Dodatkowo zaprojektowano zatem nową serię inhibitorów **199–204** o strukturach przedstawionych w tabeli 14, zawierających zmodyfikowane podstawniki P1'. Aby zapewnić zwiększoną swobodę rotacji i ułatwić powstawanie wspomnianego oddziaływania, heteroatomy grupy aminowej lub hydroksylowej „umieszczono” na mostku metylenowym (rys. 30). Należy

zwrócić uwagę, że zmiana ta istotnie modyfikuje również właściwości kwasowo-zasadowe tych group, w porównaniu do fenolowej reszty hydroksylowej związku wiodącego **198**. Dodatkowo do cząsteczki wprowadzono drugorzędową grupę aminową potencjalnie tworzącą wiązanie wodorowe z C=O Asp332. Nowe, tak zaprojektowane podstawniki P1' prezentowały więc reszty *p*-hydroksymetylo- i *p*-aminometyloaniliny (związki **200** oraz **201**) lub *p*-hydroksymetylo- i *p*-aminometylobenzyloaminy (związki **203** oraz **204**). Pochodne zawierające niepodstawiony pierścień aromatyczny (związki **199** oraz **202**) służyły jako odpowiednie substancje referencyjne do oceny skuteczności wprowadzonych modyfikacji [319].



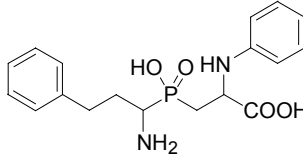
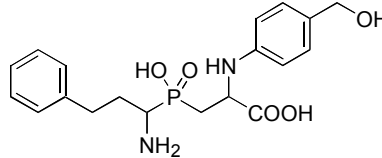
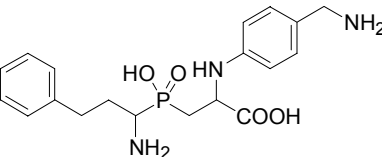
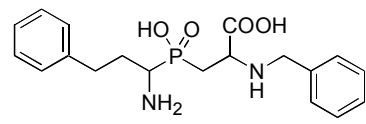
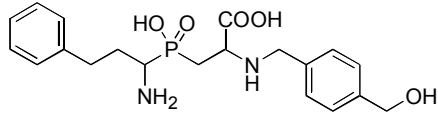
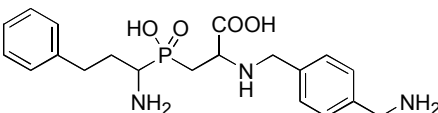
Rys. 30. Proponowany, schematyczny sposób wiązania zmodyfikowanych inhibitorów leucyloaminopeptydazy w kieszeni S1' enzymu

Fig. 30. Schematic binding mode of the modified leucine aminopeptidase inhibitors in the S1' pocket

Synteza tych związków, zaprezentowana również w rozdziale 4.2, została przeprowadzona we współpracy z Zespołem prof. Yiotakisa (Uniwersytet Ateński), natomiast otrzymane wyniki inhibicji LAP oraz APM (dr M. Pawelczak, Uniwersytet Opolski) przedstawiono w tabeli 14 [218, 319]. Większość fosfinodipeptydów **199–204** podczas oczyszczania metodą HPLC udało się dodatkowo rozdzielić na frakcje racemicznych diastereoizomerów (F_I oraz F_{II}). Wiadomo, że jedna z frakcji reprezentuje parę (*RS*,*SR*), natomiast druga (*RR*,*SS*). Niestety, jak dotychczas nie udało się przyporządkować im odpowiednich konfiguracji. Niemniej jednak, zróżnicowanie aktywności F_I i F_{II} jednoznacznie świadczy jak ważną rolę odgrywa tu stereochemia. Wyizolowanie i porównanie aktywności wszystkich czterech stereoizomerów wybranego fosfinodipeptydu – analogu homofenyloalaniny (np. H–hPheP[CH₂]Phe–OH **197**), o zdefiniowanych konfiguracjach obu stereogennych atomów węgla, ciągle stanowi największe perspektywiczne zadanie dla projektu (patrz także rozdz. 2.3 oraz 2.4).

Tabela 14. Inhibicja cytozolowej (LAP) oraz mikrosomalnej leucyloaminopeptydazy (APM) przez fosforoorganiczne inhibitory, analogi dipeptydów zawierające zmodyfikowane podstawniki aminowe w pozycji P1' (NW – nie wyznaczano K_i , brak hamowania aktywności enzymu do stężenia 20 μM)

Table 14. Inhibition of cytosolic (LAP) and microsomal leucine aminopeptidase (APM) by phosphoroorganic inhibitors, the dipeptide analogues containing modified amino substituents in their P1' positions (NW – K_i not estimated, no inhibition up to the concentration of 20 μM)

Inhibitor	K_i (LAP)	K_i (APM)
199 	570 nM (F_I)* 450 nM (F_{II})	NW
200 	10 330 nM (F_I) 6980 nM (F_{II})	900 nM (F_I) 1130 (F_{II})
201 	4460 nM	560 nM
202 	10 660 nM (F_I) 12 370 nM (F_{II})	NW
203 	4210 nM (F_I) 1420 nM (F_{II})	NW
204 	2780 nM (F_I) 2620 nM (F_{II})	19 900 nM (F_I) 26 60 nM (F_{II})

* F_I oraz F_{II} – frakcje stanowiące pary enancjomerów rozdzielone podczas oczyszczania metodą HPLC.

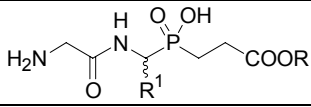

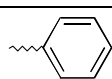
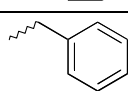
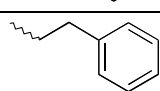
Otrzymane wyniki inhibicji LAP oraz APM przez serię związków **199–204** nie potwierdziły założeń teoretycznych. Dla wszystkich badanych fosfinopeptydów osiągnięto umiarkowane, zbliżone do siebie wyniki wartości stałych K_i (0,5–12 μM) [319]. Wynik ten może wynikać z entropowych strat w swobodnej energii wiązania tych związków spowodowanych koniecznością desolvatacji inhibitorów, które zawierają aż cztery hydrofilowe grupy funkcyjne. Świadczy o tym to, że najlepszy wynik osiągnięto dla LAP w przy-

padku najmniej funkcjonalizowanego związku **199**. Rozpatrując natomiast oddziaływania względem APM, należy stwierdzić, że badane inhibitory, zwłaszcza benzytowe pochodne **202–204**, zawierają prawdopodobnie zbyt rozbudowany podstawnik P1' utrudniający ich wiązanie do enzymu. Mimo to, daje się zauważyć wyraźną preferencję względem grup aminowych reszty P1' ligandu, co wydaje się potwierdzać istotny udział reszty Glu413 w wiązaniu w regionie S1' receptora.

5.3. Inne badania dotyczące fosfinopeptydów

Omówione przykłady opracowania fosforowych analogów peptydów jako efektywnych inhibitorów metaloproteaz matriksowych oraz leucyloaminopeptydaz nie wyczerpują wszystkich rezultatów badań podjętych w tym zakresie. Pokazują jednak istotny postęp, jaki odbywa się w tej dziedzinie dzięki zastosowaniu metod chemii kombinatorycznej oraz modelowania molekularnego. Z pozostałych osiągniętych wyników na uwagę zasługuje np. złożona synteza fosfinowego analogu tetraglicyny H–Gly–GlyP[CH₂]Gly–Gly–OH **155**. Ten potencjalny inhibitor autolizyny LytM, metalozależnego enzymu bakteryjnego hydrolizującego naturalne połączenia ścian komórkowych, posłużył następnie jako ligand do krystalizacji kompleksów białkowych [226]. Podjęto też pierwszą próbę zastosowania fosfinopeptydów do inhibicji enzymów proteolitycznych z grupy zawierających cysteinę w centrum aktywnym. Zaprojektowano i otrzymano serię analogów tripeptydów **147–150** (kwasy) oraz **205–208** (karboksylowe estry metylowe), a następnie sprawdzono ich aktywność *in vitro* w testach względem katepsyny C (peptydazy dipeptydylowej I, DPP I, EC 3.4.14.1) [219].

Tabela 15. Inhibicja katepsyny C przez fosfinowe analogi tripeptydów
H–Gly–AaaP[CH₂]Gly–OH
Table 15. Inhibition of cathepsin C by phosphinic tripeptide analogues of formula
H–Gly–AaaP[CH₂]Gly–OH

Inhibitor R ¹		K _i (R = Me)	K _i (R = H)
		0,040 mM (205)	0,039 mM (147)
		0,188 mM (206)	0,176 mM (148)
		0,514 mM (207)	0,429 mM (149)
		0,312 mM (208)	0,187 mM (150)

Otrzymane związki wykazały nietypowy mechanizm inhibicji katepsyny C. Mimo że zostały zaplanowane jako analogi stanu przejściowego hydrolizy peptydów, to wykazywały niekonkurencyjny wolno wiążący mechanizm inhibicji. O ile w przypadku estrów **205–208** proces zachodził jednoetapowo, o tyle dla kwasów **147–150** dwustopniowo – enzym po związaniu z fosfinopeptydem dodatkowo ulegał wolnej izomeryzacji. Wykazując zatem podobne powinowactwo z DPP I, obie grupy związków reprezentują całkowicie odmienne typy inhibitorów niewiążących się z miejscem aktywnym enzymu [219]. Wyjaśnienie różnic w sposobie wiązania tych inhibitorów może pozwolić na lepsze zrozumienie wymagań strukturalnych tego ważnego enzymu.

6. Podsumowanie

Koncepcja analogii ugrupowania fosfonamidowego oraz fosfinowego do wysokoenergetycznego stanu przejściowego enzymatycznej hydrolizy wiązania amidowego w substratach peptydowych zaowocowała opracowaniem niezwykle interesujących inhibitorów enzymów proteolitycznych, szczególnie metalozależnych. W tym kontekście, w prezentowanej pracy przedstawiono całościowo wyniki badań własnych autora dotyczących tego przedmiotu: począwszy od syntezy odpowiednich prekursorów wiązania P–N oraz P–C, poprzez otrzymanie docelowych struktur, a skończywszy na odpowiednich badaniach biologicznych tytułowych związków.

Przedstawiono wyniki prac dotyczących syntezy monoestrów *N*-chronionych α -aminoalkanofosfoninów oraz *H*-fosfinianów jako substratów do otrzymywania odpowiednich pseudopeptydów. Omówiono różnice w reaktywności obu typów związków i zidentyfikowano nieoczekiwane produkty uboczne towarzyszące blokowaniu ich grup funkcyjnych. Dla wybranych analogów opracowano metodę rozdziału na enancjomery, a także kontroli czystości optycznej z zastosowaniem selektorów chiralności, takich jak: cyklodekstryny czy alkaloidy chinolinowe, oraz powtarzalnych, szybkich i wiarygodnych analiz spektroskopowych lub chromatograficznych.

Otrzymane substraty posłużyły do syntezy peptydów fosfonamidowych oraz fosfinowych o zróżnicowanej strukturze. Dla związków zawierających wiązanie P–N szczegółowo studiowano i porównywano przebieg jego tworzenia w reakcjach wiodących poprzez odpowiednie fosfonochlorki. Największym osiągnięciem tego etapu badań wydaje się jednak być precyzyjne powiązanie trwałości wiązania P–N ze strukturą związku oraz z pH. Pozwoliło to na ostateczne rozstrzygnięcie uwarunkowań labilności hydrolitycznej fosfonamidów. W przypadku *O*-fenylowych analogów fosfonamidowych wykazano ponadto ich interesującą reaktywność w procesie transestryfikacji w warunkach zasadowych.

Prezentując wyniki dotyczące syntezy fosfinopeptydów, skoncentrowano się również na kilku wątkach tematycznych. Główny z nich dotyczył możliwości odpowiedniej funkcjonalizacji reszty P1' potencjalnych pseudodipeptydowych inhibitorów metaloproteaz. Przetestowano zarówno metody wiodące przez modyfikowanie substratów elektrofilowych, tj. α -podstawionych akrylanów, jak i te, które pozwalają na wielokierunkową funkcjonalizację docelowej struktury na końcowym etapie procedury. Opracowano również nowe sposoby elongacji łańcucha fosfinopeptydowego.

Na zakończenie, na tle szczegółowo omówionych wyników przedstawionych w literaturze, zaprezentowano użycie tytułowych związków do badania inhibicji wybranych metaloproteaz. Szczególnie interesujące wyniki otrzymano dla fosfinowych analogów peptydów. W przypadku metaloproteinaz matriksowych opracowano uniwersalny inhibi-

tor dla tej grupy enzymów, wykorzystując metody chemii kombinatorycznej. Posłużył on następnie jako związek wiodący do dalszych prac nad selektywnymi efektorami MMP, jak również do badań strukturalnych stromelizyny 3. Dla leucyloaminopeptydazy opisano natomiast najbardziej aktywne fosforoorganiczne inhibitory tej proteazy poznane dotychczas. Zbadano selektywność ich działania względem aminopeptydazy N. Na zaprezentowanych przykładach pokazano przydatność racjonalnych metod modelowania molekularnego wspomagających proces opracowania i optymalizacji struktury nowej substancji biologicznie czynnej.

Wyniki prac przedstawiono w kilkunastu publikacjach w czasopismach o międzynarodowym standardzie, a także w formie komunikatów konferencyjnych (patrz wykaz publikacji objętych rozprawą).

Literatura

- [1] PUENTE X.S., SANCHEZ L.M., OVERALL C.M., LOPEZ-OTIN C., *Nat. Rev. Gen.*, 2003, 4, 544–558.
- [2] PUENTE X.S., SANCHEZ L.M., GUTIERREZ-FERNANDEZ A., VELASCO, G., LOPEZ-OTIN C., *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, 33, 331–334.
- [3] LEUNG D., ABBENANTE G., FAIRLIE D.P., *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 305–341.
- [4] LEBON F., LEDECQ M., *Curr. Med. Chem.*, 2000, 7, 455–477.
- [5] WALKER B., LYNAS J.F., *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, 58, 596–624.
- [6] STEIMETZER T., HAUPTMANN J., STÜRZEBECKER J., *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 2001, 10, 845–864.
- [7] POWERS J.C., ASGIAN J.L., EKICI O D., JAMES K.E., *Chem. Rev.*, 2002, 102, 4639–4750.
- [8] CONCHA N.O., ABDEL-MEGUID S.S., *Curr. Med. Chem.*, 2002, 9, 713–726.
- [9] LEUNG-TOUNG R., LI W.R., TAM T.F., KARIMIAN K., *Curr. Med. Chem.*, 2002, 9, 979–1002.
- [10] KIM W., KANG K., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 2002, 12, 419–432.
- [11] DASH C., KULKARNI A., DUNN B., RAO M., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2003, 38, 89–119.
- [12] GOURLEY M., WILLIAMSON J.S., *Curr. Pharm. Des.*, 2000, 6, 417–439.
- [13] BROWN P.D., *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 2000, 9, 2167–2177.
- [14] SKILES J.W., GONNELLA N.C., JENG, A.Y., *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8, 425–474.
- [15] JEDINAK A., MALIAR T., *Neoplasma*, 2005, 53, 185–192.
- [16] TOMASSELLI A.G., HEINRIKSON R.L., *Biochem. Biophys. Acta*, 2000, 1477, 189–214.
- [17] DE CLERCQ E., *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8, 1543–1572.
- [18] ABDEL-RAHMAN H.M., AL-KARAMANY G.S., EL-KOUSSI N.A., YOUSSEF A.F., KISO Y., *Curr. Med. Chem.*, 2002, 9, 1905–1922.
- [19] VIERLING P., GREINER J., *Curr. Pharm. Des.*, 2003, 9, 1755–1770.
- [20] SELKOE D.J., *Physiol. Rev.*, 2001, 81, 741–766.
- [21] LARNER A.J., *Mini Rev. Med. Chem.*, 2002, 2, 1–9.
- [22] THOMPSON L.A., BRONSON J.J., ZUSI F.C., *Curr. Pharm. Des.*, 2005, 11, 3383–3404.
- [23] HIGUCHI M., IWATA N., SAIDO, T.C., *Biochem. Biophys. Acta.*, 2005, 1751, 60–67.
- [24] SUPURAN C.T., SCOZZAFAVA A., MASTROLORENZO A., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 2001, 11, 221–259.
- [25] SUPURAN C.T., SCOZZAFAVA A., CLARE B.W., *Med. Res. Rev.*, 2002, 22, 329–372.
- [26] LECAILLE F., KALETA J., BRÖMME D., *Chem. Rev.*, 2002, 102, 4459–4488.
- [27] CHUNG J.Y., BAE Y.A., NA B.K., KONG Y., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 2005, 15, 995–1007.
- [28] MEROPS – The Peptidase Database (<http://merops.sanger.ac.uk>).
- [29] *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F., (Eds.), Academic Press, Amsterdam, 2002.
- [30] PAULING L., *Am. Sci.*, 1948, 36, 51–58.
- [31] WOLFENDEN R., *Nature*, 1969, 223, 704–705.
- [32] SCHECHTER I., BERGER A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 27, 157–162.
- [33] ENDO S., *Hakko Kogaku Zashi*, 1962, 40, 346–367.
- [34] TITANI K., HERMODSON M.A., ERICSSON L.H., WALSH K.A., NEURATH H., *Nat. New Biol.*, 1972, 238, 35–37.

- [35] MATTHEWS B.W., JANSONIUS J.N., COLMAN P.M., SCHOENBORN B.P., DUPOURQUE D., *Nat. New Biol.*, 1972, 238, 37–41.
- [36] MATTHEWS B.W., COLMAN P.M., JANSONIUS J.N., TITANI K., WALSH K.A., NEURATH H., *Nat. New Biol.*, 1972, 238, 41–43.
- [37] COLMAN P.M., JANSONIUS J.N., MATTHEWS B.W., *J. Mol. Biol.*, 1972, 70, 701–724.
- [38] MATTHEWS B.W., WEAVER L.H., KESTER W.R., *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 8030–8044.
- [39] HOLMES M.A., MATTHEWS B.W., *J. Mol. Biol.*, 1982, 160, 623–639.
- [40] WEAVER L.H., KESTER W.R., MATTHEWS B.W., *J. Mol. Biol.*, 1977, 114, 119–132.
- [41] HOLMES M.A., MATTHEWS B.W., *Biochemistry*, 1981, 20, 6912–6920.
- [42] HANGAUER D.G., MONZINGO A.F., MATTHEWS B.W., *Biochemistry*, 1984, 23, 5730–5741.
- [43] REES D.C., LEWIS M., LIPSCOMB W.N., *J. Mol. Biol.*, 1983, 168, 367–387.
- [44] KESTER W.R., MATTHEWS B.W., *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 7704–7710.
- [45] MATTHEWS B.W., *Acc. Chem. Res.*, 1988, 21, 333–340.
- [46] KAM C.-M., NISHINO N., POWERS J.C., *Biochemistry*, 1979, 18, 3032–3038.
- [47] SUDA H., AOYAGI T., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., *J. Antibiot.*, 1973, 26, 621–623.
- [48] KOMIYAMA T., SUDA H., AOYAGI T., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., FUJIMOTO K., UMEZAWA S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1975, 171, 727–731.
- [49] BARTLETT P.A., MARLOWE C.K., *Biochemistry*, 1983, 22, 4618–4624.
- [50] BARTLETT P.A., MARLOWE C.K., *Biochemistry*, 1987, 26, 8553–8561.
- [51] JACOBSEN N.E., BARTLETT P.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 654–657.
- [52] YAMAUCHI K., OHTSUKI S., KINOSHITA M., *Biochem. Biophys. Acta*, 1985, 827, 275–282.
- [53] HANSON J.E., KAPLAN A.P., BARTLETT P.A., *Biochemistry*, 1989, 28, 6294–6305.
- [54] HOLDEN H.M., TRONRUD D.E., MONZINGO A.F., WEAVER L.H., MATTHEWS B.W., *Biochemistry*, 1987, 26, 8542–8553.
- [55] HOLLAND D.R., TRONRUD D., PLEY H.W., FLAHERTY K.M., STARK W., JANSONIUS J.N., MCKAY D.B., MATTHEWS B.W., *Biochemistry*, 1992, 31, 11310–11316.
- [56] HOLLAND D.R., HAUSRATH A.C., JUERS D., MATTHEWS B.W., *Protein Sci.*, 1995, 4, 1955–1965.
- [57] YIALLOUROS I., VASSILIOU S., YIOTAKIS A., ZWILLING R., STÖCKER W., DIVE V., *Biochem. J.*, 1998, 331, 375–379.
- [58] COLLINSOVÁ M., JIRÁČEK J., *Curr. Med. Chem.*, 2000, 7, 629–647.
- [59] SCHIØDT C.B., BUCHARDT J., TERP G.E., CHRISTENSEN U., BRINK M., LARSEN Y.B., MELDAL M., FOGED N.T., *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8, 967–976.
- [60] CHRISTIANSON D.W., LIPSCOMB W.N., *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 5560–5565.
- [61] KAPLAN A.P., BARTLETT P.A., *Biochemistry*, 1991, 30, 8165–8170.
- [62] TRONRUD D.E., HOLDEN H.M., MATTHEWS B.W., *Science*, 1987, 235, 571–574.
- [63] BARTLETT P.A., MARLOWE C.K., *Science*, 1987, 235, 569–571.
- [64] BASH P.A., CHANDRA SINGH U., BROWN F.K., LANGRIDGE R., KOLLMAN P.A., *Science*, 1987, 235, 574.
- [65] GROBELNY D., GOLI U.B., GALARDY R.E., *Biochemistry*, 1989, 28, 4948–4951.
- [66] MORGAN B.P., SCHOLTZ J.M., BALLINGER M.D., ZIPKIN I.D., BARTLETT P.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 297–307.
- [67] GALARDY R.E., *Biochemistry*, 1982, 21, 5777–5781.
- [68] THORSETT E.D., HARRIS E.E., PETERSON E.R., GREENLEE W.J., PATCHETT A.A., ULM E.H., VASSIL T.C., *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 1982, 79, 2176–2180.
- [69] PETRILLO E.W., ONDETTI M.A., *Med. Res. Rev.*, 1982, 2, 1–41.
- [70] GALARDY R.E., KONTOYIANNIDOU-OSTREM V., KORTYLEWICZ Z.P., *Biochemistry*, 1983, 22, 1990–1995.

- [71] PETRILLO E.W., CUSHMAN D.W., DUGGAN M.E., HEIKES J.E., KARANEWSKY D.S., ONDETTI M.A., O'REILLY B., ROVNYAK G.C., SCHWARTZ J., SPITZMILLER E.R., WANG N.-Y., In *Proceedings of the Eight American Peptide Symposium – Peptides: Structure and Function*, Hruby V.J., Rich D.H., (Eds.), Pierce Chemical Co., Rockford, 1983, 541–550.
- [72] KRAPCHO J., TURK C., CUSHMAN D.W., POWELL J.R., DEFORREST J.M., SPITZMILLER E.R., KARANEWSKY D.S., DUGGAN M.E., ROVNYAK G.C., SCHWARTZ J., NATARAJAN S., GODFREY J.D., RYONO D.E., NEUBECK R., ATWAL K.S., PETRILLO E.W., *J. Med. Chem.*, 1988, 31, 1148–1160.
- [73] MURDOCH D., MCTAVISH D., *Drugs*, 1992, 43, 123–140.
- [74] WAGSTAFF A.J., DAVIS R., MCTAVISH D., *Drugs*, 1996, 51, 777–791.
- [75] DIVE V., COTTON J., YIOTAKIS A., MICHAUD A., VASSILIOU S., JIRÁČEK J., VAZEUX G., CHAUVET M.-T., CUNIASSE P., CORVOL P., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 4330–4335.
- [76] VAZEUX G., COTTON J., CUNIASSE P., DIVE V., *Biochem. Pharmacol.*, 2001, 61, 835–841.
- [77] GEORGIADIS D., BEAU F., CZARNY B., COTTON J., YIOTAKIS A., DIVE V., *Circ. Res.*, 2003, 93, 148–154.
- [78] ROUSSEAU A., MICHAUD A., CHAUVET M.-T., LENFANT M., CORVOL P., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 3656–3661.
- [79] YIOTAKIS A., VASSILIOU S., JIRÁČEK J., DIVE V., *J. Org. Chem.*, 1996, 61, 6601–6605.
- [80] JIRÁČEK J., YIOTAKIS A., VINCENT B., LECOQ A., NICOLAU A., CHECLER F., DIVE V., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 21701–21706.
- [81] JIRÁČEK J., YIOTAKIS A., VINCENT B., CHECLER F., DIVE V., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 19606–19611.
- [82] YIOTAKIS A., GEORGIADIS D., MATZIARI M., MAKARITIS A., DIVE V., *Curr. Org. Chem.*, 2004, 8, 1135–1158.
- [83] MAFFRE-LAFON D., ESCALE R., DUMY P., VIDAL J.-P., GIRARD J.-P., *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, 4097–4098.
- [84] JUNOT C., GONZALES M.-F., EZAN E., COTTON J., VAZEUX G., MICHAUD A., AZIZI M., VASSILIOU S., YIOTAKIS A., CORVOL P., DIVE V., *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 2001, 297, 606–611.
- [85] GRAMS F., DIVE V., YIOTAKIS A., YIALLOUROU I., VASSILIOU S., ZWILLING R., BODE W., STÖCKER W., *Nat. Struct. Biol.*, 1996, 3, 671–675.
- [86] GALL A.L., RUFF M., KANNAN R., CUNIASSE P., YIOTAKIS A., DIVE V., RIO M.-C., BASSET P., MORAS D., *J. Mol. Biol.*, 2001, 307, 577–686.
- [87] SELKTI M., TOMAS A., GAUCHER J.-F., PRANGÉ T., FOURNIÉ-ZALUSKI M.-C., CHEN H., ROQUES B.-P., *Acta Cryst. D*, 2003, 59, 1200–1205.
- [88] COPIÉ V., KOLBERT A.C., DREWRY D.H., BARTLETT P.A., OAS T., GRIFFIN R.G., *Biochemistry*, 1990, 29, 9176–9184.
- [89] KAFARSKI P., LEJCZAK B., In *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids. Chemistry and Biological Activity*, Kukhar V.P., Hudson H.R., (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 2000, 173–203, 407–442.
- [90] DIVE V., LUCET-LEVANNIER K., GEORGIADIS D., COTTON J., VASSILIOU S., CUNIASSE P., YIOTAKIS A., *Biochem. Soc. Trans.*, 2000, 28, 455–460.
- [91] DIVE V., GEORGIADIS D., MATZIARI M., MAKARITIS A., BEAU F., CUNIASSE P., YIOTAKIS A., *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004, 61, 2010–2019.
- [92] CUNIASSE P., DEVEL L., MAKARITIS A., BEAU F., GEORGIADIS D., MATZIARI M., YIOTAKIS A., DIVE V., *Biochemie*, 2005, 87, 393–402.
- [93] *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids. Chemistry and Biological Activity*, Kukhar V.P., Hudson H.R., (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 2000.
- [94] KAFARSKI P., MASTALERZ P., *Beitr. Wirkstoffforschung*, 1984, 21, 1–110.

- [95] KAFARSKI P., LEJCZAK B., Phosphorus, Sulphur and Silicon, 1991, 63, 193–216.
- [96] MAIER L., DIEHL P.J., Phosphorus, Sulphur and Silicon, 1994, 90, 259–279.
- [97] DHAWAN B., REDMORE D., Phosphorus, Sulphur and Silicon, 1987, 32, 119–144.
- [98] KAFARSKI P., LEJCZAK B., Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents, 2001, 1, 301–312.
- [99] HOFFMANN M., Pol. J. Chem., 1979, 53, 1153–1158.
- [100] HOFFMANN M., Phosphorus, Sulphur and Silicon, 1992, 73, 173–184.
- [101] ŽEMLIČKA J., CHLADEK S., Collect. Czech. Chem. Commun., 1969, 34, 1007–1014.
- [102] GILMORE W.F., MCBRIDE H.A., J. Pharm. Sci., 1974, 63, 965–966.
- [103] BARTLETT P.A., HANSON J.E., GIANNOUSIS P.P., J. Org. Chem., 1990, 55, 6268–6274.
- [104] GEORGIADIS D., MATZIARI M., VASSILIOU S., DIVE V., YIOTAKIS A., Tetrahedron, 1999, 55, 14635–14648.
- [105] BAYLIS E.K., CAMPBELL C.D., DINGWALL J.G., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1984, 2845–2853.
- [106] DUMY P., ESCALE R., GIRARD J.-P., PARELLO J., VIDAL J.-P., Synthesis, 1992, 1226–1228.
- [107] DORFF P.H., CHIU G., GOLDSTEIN S.W., MORGAN B.P., Tetrahedron Lett., 1998, 39, 3375–3378.
- [108] GEORGIADIS D., MATZIARI M., YIOTAKIS A., Tetrahedron, 2001, 57, 3471–3478.
- [109] WASIELEWSKI C., SOBCZAK A., SZEWCZYK J., Roczn. Chem., 1976, 50, 1795–1799.
- [110] HOFFMANN M., J. Prakt. Chemie, 1988, 330, 820–824.
- [111] CAMPBELL D.A., BERNAK J.C., J. Am. Chem. Soc., 1994, 114, 6039–6040.
- [112] GRAY M.D.M., SMITH D.J.H., Tetrahedron Lett., 1980, 21, 859–860.
- [113] SAADY M., LEBEAU L., MIOSKOWSKI C., J. Org. Chem., 1995, 60, 2946–2947.
- [114] GALÉOTTI N., COSTE J., BEDOS P., JOUIN P., Tetrahedron Lett., 1996, 37, 3997–3998.
- [115] HOFFMANN M., Synthesis, 1986, 557–559.
- [116] WASIELEWSKI C., HOFFMANN M., WITKOWSKA E., RACHOŃ J., Roczn. Chem., 1976, 50, 1613–1620.
- [117] HOFFMANN M., WASIELEWSKI C., Roczn. Chem., 1976, 50, 139–146.
- [118] KARANEWSKY D.S., BADIA M.C., Tetrahedron Lett., 1986, 27, 1751–1754.
- [119] BARTLETT P.A., GIANGIORDANO M.A., J. Org. Chem., 1996, 61, 3433–3438.
- [120] SAMPSON N.S., BARTLETT P.A., J. Org. Chem., 1988, 53, 4500–4503.
- [121] ALLEN M.C., FUHRER W., TUCK B., WADE R., WOOD J.M., J. Med. Chem., 1989, 32, 1652–1661.
- [122] GIANNOUSIS P.P., BARTLETT P.A., J. Med. Chem., 1987, 30, 1603–1609.
- [123] GILMORE W.F., MCBRIDE H.A., J. Pharm. Sci., 1974, 63, 1087–1090.
- [124] MUCHA A., KAFARSKI P., PLENAT F., CRISTAU H.-J., Phosphorus, Sulphur and Silicon, 1995, 105, 187–193.
- [125] MUCHA A., KAFARSKI P., PLENAT F., CRISTAU H.-J., Tetrahedron, 1994, 50, 12743–12754.
- [126] MUCHA A., KAFARSKI P., Tetrahedron, 2002, 58, 5855–5863.
- [127] VO-QUANG Y., GRAVEY A.M., SIMONNEAU R., VO-QUANG L., LACOSTE A.M., LE GOFFIC F., Tetrahedron Lett., 1987, 28, 6167–6170.
- [128] YANG K.W., BRANDT J.J., CHATWOOD L.L., CROWDER M.W., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2000, 10, 1085–1087.
- [129] OLEKSYSZYN J., SUBOTKOWSKA L., MASTALERZ P., Synthesis, 1979, 985–986.
- [130] SZEWCZYK J., LEJCZAK B., KAFARSKI P., Synthesis, 1982, 409–412.
- [131] GREMBECKA J., MUCHA A., CIERPICKI T., KAFARSKI P., J. Med. Chem., 2003, 46, 2641–2655.
- [132] MUCHA A., GREMBECKA J., CIERPICKI T., KAFARSKI P., Eur. J. Org. Chem., 2003, 46, 4797–4803.
- [133] STANO A., MUCHA A., KAFARSKI P., Synthetic Commun., 1999, 29, 4269–4277.
- [134] GALLAGHER M.J., HONEGGER H., Aust. J. Chem., 1980, 33, 287–294.

- [135] KUKHAR V.P., SOLOSHONOK V.A., SOLODENKO V.A., Phosphorus, Sulfur and Silicon, 1994, 92, 239–264.
- [136] KOLODIAZHNYI O.I., Tetrahedron: Asymmetry, 1998, 9, 1279–1332.
- [137] KUKHAR V.P., In *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids. Chemistry and Biological Activity*, Kukhar V.P., Hudson H.R., (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 2000, 127–172.
- [138] MUCHA A., TYKA R., SAWKA-DOBROWOLSKA W., GŁOWIAK T., Phosphorus, Sulphur and Silicon, 1995, 104, 129–138.
- [139] LÄMMERHOFER M., LINDNER W., J. Chromatogr. A, 1996, 741, 33–48.
- [140] MAIER N.M., NICOLETTI L., LÄMMERHOFER M., LINDNER W., Chirality, 1999, 11, 522–528.
- [141] LÄMMERHOFER M., HEBENSTREIT D., GAVIOLI E., LINDNER W., MUCHA A., KAFARSKI P., WIECZOREK P., Tetrahedron: Asymmetry, 2003, 14, 2557–2565.
- [142] CZERWENKA C., LÄMMERHOFER M., MAIER N.M., RISSANEN K., LINDNER W., Anal. Chem., 2002, 74, 5658–5666.
- [143] MAIER N.M., SCHEFZICK S., LOMBARDO G.M., FELIZ M., RISSANEN K., LINDNER W., LIPKOWITZ K.B., J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 8611–8629.
- [144] ZARBL E., LÄMMERHOFER M., HAMMERSCHMIDT F., WUGGENIG F., HANBAUER M., MAIER N.M., SAJOVIC L., LINDNER W., Anal. Chim. Acta, 2000, 404, 169–177.
- [145] LÄMMERHOFER M., ZARBL E., LINDNER W., PERIC SIMOW B., HAMMERSCHMIDT F., Electrophoresis, 2001, 22, 1182–1187.
- [146] DŻYGIEL P., RUDZIŃSKA E., WIECZOREK P., KAFARSKI P., J. Chromatogr. A, 2000, 895, 301–307.
- [147] RUDZIŃSKA E., DŻYGIEL P., WIECZOREK P., KAFARSKI P., J. Chromatogr. A, 2002, 979, 115–122.
- [148] RUDZIŃSKA E., WIECZOREK P., KAFARSKI P., Electrophoresis, 2003, 15, 2693–2697.
- [149] BERLICKI Ł., RUDZIŃSKA E., KAFARSKI P., Tetrahedron: Asymmetry, 2003, 14, 1535–1539.
- [150] BERLICKI Ł., RUDZIŃSKA E., MUCHA A., KAFARSKI P., Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15, 1597–1602.
- [151] RUDZIŃSKA E., DRAPAŁA A., BERLICKI Ł., MUCHA A., DŻYGIEL P., WIECZOREK P., KAFARSKI P., praca złożona do J. Chromatogr. A.
- [152] BERLICKI Ł., RUDZIŃSKA E., MUCHA A., LÄMMERHOFER M., LINDNER W., KAFARSKI P., In *18th Polish Peptide Symposium*, Wrocław 2005, 85.
- [153] BARTLETT P.A., MARLOWE C.K., GIANNOUSIS P.E., HANSON J.E., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1987, 52, 83–90.
- [154] YAMAUCHI K., KINOSHITA M., IMOTO M., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1972, 45, 2528–2531.
- [155] YAMAUCHI K., KINOSHITA M., IMOTO M., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1972, 45, 2531–2534.
- [156] YAMAUCHI K., MITSUDA Y., KINOSHITA M., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1975, 48, 3285–3286.
- [157] HARIHARAN M., CHABEREK S., MARTELL A.E., Synth. Commun., 1973, 3, 375–379.
- [158] HARIHARAN M., MOTEKAITES R.J., MARTELL A.E., J. Org. Chem., 1975, 40, 470–473.
- [159] JACOBSEN N.E., BARTLETT P.A., J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 1613–1619.
- [160] JACOBSEN N.E., BARTLETT P.A., J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 1619–1626.
- [161] MALACHOWSKI W.P., COWARD J.K., J. Org. Chem., 1994, 59, 7616–7624.
- [162] MALACHOWSKI W.P., COWARD J.K., J. Org. Chem., 1994, 59, 7625–7634.
- [163] HIRSCHMANN R., YAGER K.M., TAYLOR C.M., MOORE W., SPRENGELER P.A., WITHERINGTON J., PHILLIPS B.W., SMITH A.B.III, J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 6370–6371.
- [164] HIRSCHMANN R., YAGER K.M., TAYLOR C.M., WITHERINGTON J., SPRENGELER P.A., PHILLIPS B.W., MOORE W., SMITH A.B.III, J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 8177–8190.
- [165] YAMAUCHI K., OHTSUKI S., KINOSHITA M., J. Org. Chem., 1984, 49, 1158–1163.
- [166] ELLIOTT R.L., MARKS N., BERG M.J., PORTOGHESE P.S., J. Med. Chem., 1985, 28, 1208–1216.

- [167] MOOKTHIAR K.A., MARLOWE C.K., BARTLETT P.A., VAN WART H.E., *Biochemistry*, 1987, 26, 1962–1965.
- [168] YIOTAKIS A., LECOQ A., NICOLAOU A., LABADIE J., DIVE V., *Biochem. J.*, 1994, 303, 323–327.
- [169] BARTLETT P.A., LAMDEN L.A., *Bioorg. Chem.*, 1986, 14, 356–377.
- [170] MCLEOD D.A., BRINKWORTH R.I., ASHLEY J.A., JANDA K.D., WIRSCHING P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1991, 1, 653–658.
- [171] YUAN C., WANG G., *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 1992, 71, 207–212.
- [172] CAMP N.P., HAWKINS P.C.D., HITCHCOCK P.B., GANI D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1992, 2, 1047–1052.
- [173] BATESON J.H., GASSON B.C., KHUSHI T., NEALE J.E., PAYNE D.J., TOLSON D.A., WALKER G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1667–1672.
- [174] MUSIOL H.-J., GRAMS F., RUDOLPH-BÖHNER S., MORODER L., *J. Org. Chem.*, 1994, 59, 6144–6146.
- [175] CAMP N.P., PERRY D.A., KINCHINGTON D., HAWKINS P.C.D., GANI D., *Bioorg. Med. Chem.*, 1995, 3, 297–312.
- [176] ISSLEIB K., DÖPFER K.P., BALSZUWEIT A., *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.*, 1983, 13, 527–536.
- [177] NATCHEV I.A., *Tetrahedron*, 1991, 47, 1239–1248.
- [178] NATCHEV I.A., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1988, 61, 3705–3711.
- [179] SIKORA D., NONAS T., GAJDA T., *Tetrahedron*, 2001, 57, 1619–1625.
- [180] ATHERTON F.R., OPENSHAW H.T., TODD A.R., *J. Chem. Soc.*, 1945, 660–663.
- [181] ELHADDADI M., JACQUIER R., PETRUS C., PETRUS F., *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 1991, 63, 255–259.
- [182] CHEN R.Y., DAN S.C., *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 1991, 56, 39–48.
- [183] DUMY P., ESCALE R., VIDAL J.-P., GIRARD J.-P., PARELLO J., *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 1991, 312, 235–240.
- [184] CHRISTIANSON D.W., LIPSCOMB W.N., *J. Am Chem. Soc.*, 1986, 108, 545–546.
- [185] YUAN W., MUNOZ B., WONG C.-H., HAEGGSTOEM J.Z., WETTERHOLM A., SAMUELSSON B., *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 211–220.
- [186] CULLIS P.M., HARGER M.J.P., *Chem. Commun.*, 2002, 458–459.
- [187] OLEKSYSZYN J., POWERS J.C., *Biochemistry*, 1991, 30, 485–493.
- [188] POWERS J.C., ODAKE S., OLEKSYSZYN J., HORI H., UEDA T., BODUSZEK B., KAM C.M., In *Proteases, Protease Inhibitors and Protease-Derived Peptides*, Cheronis J.C., Repine J.E., (Eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, 3–18.
- [189] OLEKSYSZYN J., In *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids. Chemistry and Biological Activity*, Kukhar V.P., Hudson H.R., (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 2000, 537–558.
- [190] SAMPSON N.S., BARTLETT P.A., *Biochemistry*, 1991, 30, 2255–2263.
- [191] BONE R., SAMPSON N.S., BARTLETT P.A., AGARD D.A., *Biochemistry*, 1991, 30, 2263–2272.
- [192] CHEN R.Y., DAN S.C., *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 1990, 51/52, 481–484.
- [193] MUCHA A., KUNERT A., GREMBECKA J., PAWEŁCZAK M., KAFARSKI P., *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, w druku.
- [194] MATHIS F., *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 1976, 1, 109–128.
- [195] HARGER M.J.P., PATER C., *Chem. Commun.*, 1999, 931–932.
- [196] THOTTATHIL J.K., RYONO D.E., PRZYBYLA C.A., MONIOT J.L., NEUBECK R., *Tetrahedron Lett.*, 1984, 25, 4741–4744.
- [197] THOTTATHIL J.K., PRZYBYLA C.A., MONIOT J.L., *Tetrahedron Lett.*, 1984, 25, 4737–4740.
- [198] BOYD E.A., REAGAN A.C., JAMES K., *Tetrahedron Lett.*, 1992, 33, 813–816.

- [199] BOYD E.A., REAGAN A.C., JAMES K., *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, 4223–4226.
- [200] BOYD E.A., BOYD M.E.K., LOH V.M.JR., *Tetrahedron Lett.*, 1996, 37, 1651–1654.
- [201] LIU X., HU X.E., TIAN X., MAZUR A., EBETINO F.H., *J. Organomet. Chem.*, 2002, 646, 212–222.
- [202] PARSONS W.H., PATCHETT A.A., BULL H.G., SCHOEN W.R., TAUB D., DAVIDSON J., COMBS P.L., SPRINGER J.P., GADEBUSCH H., WEISSBERGER B., VALIANT M.E., MELLIN T.N., BUSCH R.D., *J. Med. Chem.*, 1998, 31, 1772–1778.
- [203] CRISTAU H.-J., COULOMBEAU A., GENEVOIS-BORELLA A., PIRAT J.-L., *Tetrahedron Lett.*, 2001, 42, 4491–4494.
- [204] CRISTAU H.-J., COULOMBEAU A., GENEVOIS-BORELLA A., SANCHEZ F., PIRAT J.-L., *J. Organomet. Chem.*, 2002, 643/644, 381–391.
- [205] MALY D.J., HUANG L., ELLMAN J.A., *ChemBioChem*, 2002, 3, 17–37.
- [206] BATRA S., SRINIVASAN T., RASTOGI S.K., KUNDU B., *Curr. Med. Chem.*, 2002, 9, 307–319.
- [207] CAMPAGNE J.-M., COSTE J., GUILLOU L., HEITZ A., JOUIN P., *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 4181–4184.
- [208] MATZIARI M., YIOTAKIS A., *Org. Lett.*, 2005, 7, 4049–4052.
- [209] BUCHARDT J., FERRERAS M., KROG-JENSEN C., DELAISSÉ J.-M., FOGED N.T., MELDAL M., *Chem. Eur. J.*, 1999, 5, 2877–2884.
- [210] VALIAEVA N., BARTLEY D., KONNO T., COWARD J.K., *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 5146–5154.
- [211] BARTLEY D.M., COWARD J.K., *J. Org. Chem.*, 2005, 70, 6757–6774.
- [212] KENDE A.S., DONG H.-Q., LIU X., EBETINO F.H., *Tetrahedron Lett.*, 2002, 43, 4973–4976.
- [213] MATZIARI M., GEORGIADIS D., DIVE V., YIOTAKIS A., *Org. Lett.*, 2001, 3, 659–662.
- [214] MATZIARI M., BEAU F., CUNIASSE P., DIVE V., YIOTAKIS A., *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 325–336.
- [215] MAKARITIS A., GEORGIADIS D., DIVE V., YIOTAKIS A., *Chem. Eur. J.*, 2003, 9, 2079–2094.
- [216] STETTER H., KUHLMANN H., *Synthesis*, 1979, 29–30.
- [217] CZUBAK M., KUNERT A., OLEJKO A., GREMBECKA J., MUCHA A., KAFARSKI P., In *XLVII Zjazd PTChem i SITPChem, Materiały Zjazdowe, Tom 1*, Wrocław 2004, 80.
- [218] VASSILIOU S., XEILARI M., MUCHA A., YIOTAKIS A., In *1st Hellenic Symposium of Organic Synthesis from Chemistry to Biology, Medicine and Material Science*, Athens 2004, 114.
- [219] MUCHA A., PAWEŁCZAK M., HUREK J., KAFARSKI P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 3113–3116.
- [220] GAŁĘZOWSKA J., SOBEK S., DRĄG M., MUCHA A., KAFARSKI P., KOZŁOWSKI H., *Pol. J. Chem.*, 2005, 79, 603–617.
- [221] BERLICKI Ł., MUCHA A., KAFARSKI P., w przygotowaniu.
- [222] GEORGIADIS D., DIVE V., YIOTAKIS A., *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 6604–6610.
- [223] REITER L.A., JONES B.P., *J. Org. Chem.*, 1997, 62, 2808–2812.
- [224] CHEN H., NOBLE F., MOTHÉ A., MEUDAL H., CORIC P., DANASCIMENTO S., ROQUES B.P., GEORGE P., FOURNIÉ-ZALUSKI M.-C., *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 1398–1408.
- [225] RAGUIN O., FOURNIÉ-ZALUSKI M.-C., ROMIEU A., PÉLEGRIN A., CHATALET F., PÉLAPRAT D., BARBET J., ROQUES B.P., GRUAZ-GUYON A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44, 4058–4061.
- [226] FIRZUK M., MUCHA A., BOCHTLER M., *J. Mol. Biol.*, 2005, 354, 578–590.
- [227] BOCHTLER M., ODINTSOV S., MARCYJANIAK M., SABALA I., *Protein Sci.*, 2004, 13, 854–861.
- [228] BERLICKI Ł., *Projektowanie i synteza inhibitorów syntetazy glutaminy*, Praca doktorska, Wrocław, 2004.
- [229] RADKIEWICZ J.L., MCALLISTER M.A., GOLDSTEIN E., HOUK K.N., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 1419–1428.
- [230] PEYMAN A., In *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids. Chemistry and Biological Activity*, Kukhar V.P., Hudson H.R., (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 2000, 559–577.

- [231] BARTLETT P.A., HANSON J.E., ACHER F., GIANNOUSIS P.P., In *Biophosphates and Their Analogues – Synthesis, Structure, Metabolism and Activity*, Bruzik K.S., Stec W.J., (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1986, 429–440.
- [232] GALARDY R.E., GROBELNY D., *Biochemistry*, 1983, 22, 4556–4561.
- [233] DIVE V., YIOTAKIS A., NICOLAOU A., TOMA F., *Eur. J. Biochem.*, 1990, 191, 685–693.
- [234] BARELLI H., DIVE V., YIOTAKIS A., VINCENT J.-P., CHECLER F., *Biochem. J.*, 1992, 287, 621–625.
- [235] VINCENT B., DIVE V., YIOTAKIS A., SMADJA C., MALDONADO R., VINCENT J.-P., CHECLER F., *Brit. J. Pharmacol.*, 1995, 115, 1053–1063.
- [236] YIOTAKIS A., LECOQ A., VASSILIOU S., RAYNAL I., CUNIASSE P., DIVE V., *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 2713–2720.
- [237] CHACKALAMANNIL S., CHUNG S., STAMFORD A.W., MCKITTRICK B.A., WANG Y., TSAI H., CLEVEN R., FAWZI A., CZARNIECKI M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, 1257–1260.
- [238] MCKITTRICK B.A., STAMFORD A.W., WENG X., MA K., CHACKALAMANNIL S., CZARNIECKI M., CLEVEN R.M., FAWZI A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, 1629–1634.
- [239] LLOYD J., SCHMIDT J.B., HUNT J.T., BARRISH J.C., LITTLE D.K., TYMIAK A.A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, 1323–1326.
- [240] GEORGIADIS D., VAZEUX G., LLORENS-CORTES C., YIOTAKIS A., DIVE V., *Biochemistry*, 2000, 39, 1152–1155.
- [241] CHEN H., NOBLE F., ROQUES B.P., FOURNIÉ-ZALUSKI M.-C., *J. Med. Chem.*, 2001, 44, 3523–3530.
- [242] GURULINGAPPA H., BUCKHALTS P., KINZLER K.W., VOGELSTEIN B., KHAN S.R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 3531–3533.
- [243] BARTLETT P.A., KEZER W.B., *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 4282–4283.
- [244] FRASER M.E., STRYNADKA N.C.J., BARTLETT P.A., HANSON J.E., JAMES M.N.G., *Biochemistry*, 1992, 31, 5201–5214.
- [245] DREYER G.B., METCALF B.W., TOMASZEK T.A.JR., CARR T.J., CHANDLER A.C.I., HYLAND R., FAKHOURY S.A., MAGAARD V.W., MOORE M.L., STRICKLER J.E., DEBOUCK C., MEEK T.D., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 9752–9756.
- [246] GROBELNY D., WONDRAK E.M., GALARDY R.E., OROSZLAN S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 169, 1111–1116.
- [247] ABDEL-MEGUID S.S., ZHAO B., MURTHY K.H.M., WINBORNE E., CHOI J.-K., DESJARLAIS R.L., MINNICH M.D., CULP J.S., DEBOUCK C., TOMASZEK T.A.JR., MEEK T.D., DREYER G.B., *Biochemistry*, 1993, 32, 7972–7980.
- [248] PEYMAN A., WAGNER K., BUDT K.-H., SPANIG J., RUPPERT D., MEICHSNER C., PAESSENS A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1191–1194.
- [249] TOH H., ONO M., SAIGO K., MIYATA T., *Nature*, 1985, 315, 691.
- [250] PEARL L.H., TAYLOR W.R., *Nature*, 1987, 329, 351–354.
- [251] WALKER B., WHARRY S., HAMILTON R.J., MARTIN S.L., HEALY A., WALKER B.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 276, 1235–1239.
- [252] GREEN D.ST.C., SKORDALAKES E., SCULLY M.F., DEADMAN J.J., In *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids. Chemistry and Biological Activity*, Kukhar V.P., Hudson H.R., (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 2000, 579–596.
- [253] PAYNE D.J., WENSHENG D., BATESON J.H., *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 2000, 9, 247–261.
- [254] HIRATAKE J., *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, 2002, 60, 1095–1103.
- [255] EL ZOEIBY A., SANSCHAGRIN F., LEVESQUE R.C., *Mol. Microbiol.*, 2003, 47, 1–12.
- [256] SILVER L.L., *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003, 6, 431–438.
- [257] NAGASE H., WOESSNER J.F.JR., *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 21491–21494.

- [258] VISSE R., NAGASE H., *Circ. Res.*, 2003, 92, 827–839.
- [259] STERNLICHT M.D., WERB Z., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2001, 17, 463–516.
- [260] STAMENKOVIC I., *J. Pathol.*, 2003, 200, 448–464.
- [261] CURRAN S., MURRAY G. I., *J. Pathol.*, 1999, 189, 300–308.
- [262] JOHANSSON N., AHONEN M., KÄHÄRI V.-M., *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2000, 57, 5–15.
- [263] VIHINEN P., KÄHÄRI V.-M., *Int. J. Cancer*, 2002, 99, 157–166.
- [264] HANDSLEY M.M., EDWARDS D.R., *Int. J. Cancer*, 2005, 115, 849–860.
- [265] MICHAELIDES M.R., CURTIN M.L., *Curr. Pharm. Design*, 1999, 5, 787–819.
- [266] WHITTAKER M., FLOYD C.D., BROWN P., GEARING A.J.H., *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2735–2776.
- [267] COUSSENS L.M., FINGLETON B., MATRISIAN L.M., *Science*, 2002, 295, 2387–2392.
- [268] BREUER E., FRANT J., REICH R., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 2005, 15, 253–269.
- [269] CHEN E.X., SIU L.L., *Curr. Pharm. Design*, 2005, 11, 265–272.
- [270] RAO B.G., *Curr. Pharm. Design*, 2005, 11, 295–322.
- [271] GALARDY R.E., GROBELNY D., KORTYLEWICZ Z.P., PONCZ L., In *Matrix Metalloproteinases Inhib.*, *Proc. Matrix Metalloproteinase Conf. 1989*, Birkekal-Hansen H., (Ed.), Fischer, Stuttgart, 1992, 259–262.
- [272] KORTYLEWICZ Z.P., GALARDY R.E., *J. Med. Chem.*, 1990, 33, 263–273.
- [273] GOULET J.L., KINNEARY J.F., DURETTE P.L., STEIN R.L., HARRISON R.K., IZQUIERDO-MARTIN M., KUO D.W., LIN T.-Y., HAGMANN W.K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1221–1224.
- [274] CALDWELL C.G., SAHOO S.P., POLO S.A., EVERSOLE R.R., LANZA T.J., MILLS S.G., NIEDZWIECKI L.M., IZQUIERDO-MARTIN M., CHANG B.C., HARRISON R.K., KUO D.W., LIN T.-Y., STEIN R.L., DURETTE P.L., HAGMANN W.K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, 323–328.
- [275] VASSILIOU S., MUCHA A., CUNIASSE P., GEORGIADIS D., LUCET-LEVANNIER K., BEAU F., KANNAN R., MURPHY G., KNÄUPER V., RIO M.-C., BASSET P., YIOTAKIS A., DIVE V., *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 2610–2620.
- [276] BASSET P., BELLOCQ J.P., WOLF C., STOLL I., HUTIN P., LIMACHER J.M., PODHAJECER O.L., CHENARD M.-P., RIO M.-C., CHAMBON P., *Nature*, 1990, 348, 699–704.
- [277] MUCHA A., CUNIASSE P., BEAU F., DIVE V., In *Peptydy '99, XV Polskie Sympozjum Peptydowe*, Waplewo k/Olsztyna 1999, K–21.
- [278] LOVEJOY B., CLEASBY A., HASSELL A.M., LONGLEY K., LUTHER M.A., WEIGL D., MCGEEHAN G., MCELROY A.B., DREWRY D., LAMBERT M.H., JORDAN S.R., *Science*, 1994, 263, 375–377.
- [279] MASKOS K., *Biochemie*, 2005, 87, 249–263.
- [280] MUCHA A., CUNIASSE P., KANNAN R., BEAU F., YIOTAKIS A., BASSET P., DIVE V., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 2763–2768.
- [281] REITER L.A., RIZZI J.P., PANDIT J., LASUT M.J., MCGAHEE S.M., PARIKH V.D., BLAKE J.F., DANLEY D.E., LAIRD E.R., LOPEZ-ANAYA A., LOPRESTI-MORROW L.L., MANSOUR M.N., MARTINELLI G.J., MITCHELL P.G., OWENS B.S., PAULY T.A., REEVES L.M., SCHULTE G.K., YOCUM S.A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 127–132.
- [282] REITER L.A., MITCHELL P.G., MARTINELLI G.J., LOPRESTI-MORROW L.L., YOCUM S.A., ESKRA J.D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 2331–2336.
- [283] BUCHARDT J., SCHIØDT C.B., KROG-JENSEN C., DELAISSÉ J.-M., FOGED N.T., MELDAL M., *J. Comb. Chem.*, 2000, 2, 624–638.
- [284] CHRISTENSEN U., GROTH T., SCHIØDT C.B., FOGED N.T., MELDAL M., *QSAR Comb. Sci.*, 2003, 22, 737–744.
- [285] TAYLOR A., *Trends Biochem. Sci.*, 1993, 18, 167–171.

- [286] TAYLOR A., FASEB J., 1993, 7, 290–298.
- [287] KIM H., LIPSCOMB W.N., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1994, 68, 153–213.
- [288] STRÄTER N., LIPSCOMB W.N., *Biochemistry*, 1995, 34, 14792–14800.
- [289] STRÄTER N., LIPSCOMB W.N., In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F., (Eds.), Academic Press, Amsterdam, 2002, 1384–1389.
- [290] UMEZAWA H., *Recent Results Cancer Res.*, 1980, 75, 115–125.
- [291] GUPTA S.K., AZIZ M., KHAN A.A., *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 1989, 32, 301–305.
- [292] TAYLOR A., DAIMS M., LEE J., SURGENOR T., *Curr. Eye Res.*, 1982, 2, 47–56.
- [293] TAYLOR A., BROWN M.J., DAIMS M.A., COHEN J., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1983, 24, 1172–1180.
- [294] TAYLOR A., SURGENOR T., THOMSON D.K., GRAHAM R.J., OETTGEN H., *Exp. Eye Res.*, 1984, 38, 217–229.
- [295] SCOTT C. S., DAVEY M., HAMILTON A., NORFOLK D.R., *Blut*, 1986, 52, 297–303.
- [296] PULIDO-CEJUDO G., CONWAY B., PROULX P., BROWN R., IZAGUIRRE C.A., *Antiviral Res.*, 1997, 36, 167–177.
- [297] SUDA H., AOYAGI T., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, 177, 196–200.
- [298] TAYLOR A., PELTIER C.Z., TORRE F.J., HAKAMIAN N., *Biochemistry*, 1993, 32, 784–790.
- [299] WILKES S.H., PRESCOTT J.M., *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 13154–13162.
- [300] KIM H., LIPSCOMB W.N., *Biochemistry*, 1993, 32, 8465–8478.
- [301] KIM H., BURLEY S.K., LIPSCOMB W.N., *J. Mol. Biol.*, 1993, 230, 722–724.
- [302] BURLEY S.K., DAVID P.R., SWEET R.M., TAYLOR A., LIPSCOMB W.N., *J. Mol. Biol.*, 1992, 224, 113–140.
- [303] GREMBECKA J., KAFARSKI P., *Mini Rev. Med. Chem.*, 2001, 1, 133–144.
- [304] LEJCZAK B., KAFARSKI P., ZYGMUNT J., *Biochemistry*, 1989, 28, 3549–3555.
- [305] BÖHM H.J., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 1992, 6, 593–606.
- [306] BÖHM H.J., *J. Mol. Recognit.*, 1993, 6, 131–137.
- [307] BÖHM H.J., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 1994, 8, 623–632.
- [308] BÖHM H.J., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 1996, 10, 265–272.
- [309] STRÄTER N., LIPSCOMB W.N., *Biochemistry*, 1995, 34, 9200–9210.
- [310] GREMBECKA J., SOKALSKI W.A., KAFARSKI P., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2000, 14, 531–544.
- [311] GREMBECKA J., SOKALSKI W.A., KAFARSKI P., *Int. J. Quant. Chem.*, 2001, 84, 302–310.
- [312] KAFARSKI P., GREMBECKA J., MUCHA A., PAWEŁCZAK M., DRĄG M., BERLICKI Ł., OLECHNOWICZ D., *Przemysł Chemiczny*, 2003, 82, 1087–1089.
- [313] BERLICKI Ł., KAFARSKI P., *Curr. Org. Chem.*, 2005, 9, 1829–1850.
- [314] BERLICKI Ł., OBOJSKA A., FORLANI G., KAFARSKI P., *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 6340–6349.
- [315] MUCHA A., GREMBECKA J., CIERPICKI T., KAFARSKI P., In *Biologically Active Peptides, VIIIth Conference, Collection Symposium Series*, Slaninova J., (Ed.), Prague, 2001, 28–31.
- [316] GREMBECKA J., MUCHA A., CIERPICKI T., KAFARSKI P., *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 2002, 177, 1739–1743.
- [317] DRĄG M., GREMBECKA J., PAWEŁCZAK M., KAFARSKI P., *Eur. J. Med. Chem.*, 2005, 40, 764–771.
- [318] ANDERSSON L., ISLEY T.C., WOLFENDEN R., *Biochemistry*, 1982, 21, 4177–4180.
- [319] MUCHA A., GREMBECKA J., VASSILIOU S., XEILARI M., YIOTAKIS A., PAWEŁCZAK M., KAFARSKI P., In *18th Polish Peptide Symposium*, Wrocław 2005, 179.

Wykaz publikacji objętych rozprawą

W niniejszej rozprawie zaprezentowano wyniki badań własnych autora, przeprowadzonych w latach 1994–2005 w Instytucie Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii (w Zakładzie Chemii Bioorganicznej) Politechniki Wrocławskiej oraz podczas stażu doktorskiego w Departement d'Ingenierie et d'Etudes des Proteines, CEA Saclay we Francji. Część badań realizowana była we współpracy z partnerami krajowymi: Uniwersytetem Wrocławskim, Uniwersytetem Opolskim oraz Międzynarodowym Instytutem Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, a także zagranicznymi: Uniwersytetem Wiedeńskim oraz Uniwersytetem Ateńskim. Fragment pracy dotyczący inhibitorów leucyloaminopeptydazy oraz katepsyny C wykonywany był w ramach grantu finansowanego przez KBN (P04B 021 18).

Większość zaprezentowanych wyników została opublikowana w formie artykułów naukowych w międzynarodowych czasopismach chemicznych i biomedycznych (szczegółowy wykaz poniżej). Kilka kolejnych artykułów (cytowania [151, 193, 221]) zostało złożonych do druku lub jest w końcowych stadiach przygotowania. W przypadku nieopublikowanych wyników podano natomiast miejsce ich prezentacji jako komunikatów na odpowiednich konferencjach i sympozjach naukowych (cytowania [152, 217, 218, 277, 319]).

1. Mucha A., Tyka R., Sawka-Dobrowolska W., Głowiak T., *Resolution, Crystal Structure and Absolute Configuration of the Enantiomers of Aminophenylmethanephosphonous Acid Hydrate*, Phosphorus, Sulphur and Silicon, 1995, 104, 129–138.
2. Mucha A., Kafarski P., Plenat F., Cristau H.-J., *The Preparation of Phosphono Peptides Containing a Phosphoramidate Bond*, Tetrahedron, 1994, 50, 12743–12754.
3. Mucha A., Kafarski P., Plenat F., Cristau H.-J., *Preparation of Benzyl N-Benzylloxycarbonylamino phosphonates and -Aminophosphinates – the Scope and Limitations of O-Benzyl-L,N,N'-dicyclohexylisourea Method*, Phosphorus, Sulphur and Silicon, 1995, 105, 187–193.
4. Mucha A., Cuniasse P., Kannan R., Beau F., Yiotakis A., Basset P., Dive V., *Membrane Type-1 Matrix Metalloprotease and Stromelysin-3 Cleave More Efficiently Synthetic Substrates Containing Unusual Amino Acids in Their P₁' Positions*, J. Biol. Chem., 1998, 273, 2763–2768.
5. Vassiliou S., Mucha A., Cuniasse P., Georgiadis D., Lucet-Levannier K., Beau F., Kannan R., Murphy G., Knäuper V., Rio M.-C., Basset P., Yiotakis A., Dive V., *Phosphinic Pseudo-Tripeptides as Potent Inhibitors of Matrix Metalloproteinases: A Structure – Activity Study*, J. Med. Chem., 1999, 42, 2610–2620.
6. Stano A., Mucha A., Kafarski P., *Reaction of N-(Benzylloxycarbonyl)aminobenzylphosphonous Acid with Triethyl Orthoformate*, Synthetic Commun., 1999, 29, 4269–4277.

7. Mucha A., Grembecka J., Cierpicki T., Kafarski P., *The Synthesis of Phosphoramidate and Phosphinic Dipeptide Analogues – Inhibitors of Leucine Aminopeptidase*, In *Biologically Active Peptides*, VIIth Conference, Collection Symposium Series, Slaninova J., (Ed.), Prague, 2001, 28–31.
8. Mucha A., Kafarski P., *Transesterification of Monophenyl Phosphoramidates – Chemical Modelling of Serine Proteases Inhibition*, *Tetrahedron*, 2002, 58, 5855–5863.
9. Grembecka J., Mucha A., Cierpicki T., Kafarski P., *Structure-Based Design and Synthesis of Dipeptide Analogues as New Inhibitors of Leucine Aminopeptidase*, *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 2002, 177, 1739–1743.
10. Kafarski P., Grembecka J., Mucha A., Pawelczak M., Drag M., Berlicki Ł., Olechnowicz D., *Projektowanie Potencjalnych Leków i Pesticydów z Wykorzystaniem Wiedzy o Strukturze Przestrzennej Enzymów*, *Przemysł Chemiczny*, 2003, 82, 1087–1089.
11. Lämmerhofer M., Hebenstreit D., Gavioli E., Lindner W., Mucha A., Kafarski P., Wieczorek P., *High-Performance Liquid Chromatographic Enantiomer Separation and Determination of Absolute Configuration of Phosphinic Acid Analogues of Dipeptides and Their Aminophosphinic Precursors*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, 14, 2557–2565.
12. Grembecka J., Mucha A., Cierpicki T., Kafarski P., *The Most Potent Organophosphorus Inhibitors of Leucine Aminopeptidase. Structure-Based Design, Chemistry and Activity*, *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 2641–2655.
13. Mucha A., Grembecka J., Cierpicki T., Kafarski P., *Hydrolysis of the Phosphoramidate Bond in Phosphono Dipeptide Analogues – the Influence of the Nature of the N-Terminal Functional Group*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 46 4797–4803.
14. Berlicki Ł., Rudzińska E., Mucha A., Kafarski P., *Cyclodextrins as NMR Probe for Study of Enantiomeric Compositions of N-Benzylloxycarbonylamino-phosphonic and Phosphinic Acids*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15, 1597–1602.
15. Mucha A., Pawelczak M., Hurek J., Kafarski P., *Synthesis and Activity of Phosphinic Tripeptide Inhibitors of Cathepsin C*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 3113–3116.
16. Gałęzowska J., Sobek S., Drag M., Mucha A., Kafarski P., Kozłowski H., *Specific Interactions of Divalent Metal Ions with Phosphonic Analogues of Dipeptide Inhibitors of Proteases*, *Pol. J. Chem.*, 2005, 79, 603–617.
17. Firczuk M., Mucha A., Bochtler M., *Crystal Structures of Active LytM*, *J. Mol. Biol.*, 2005, 354, 578–590.

Phosphoramidate and phosphinate inhibitors of metalloproteases

Synthesis and biological activity of pseudopeptides containing phosphoramidate or phosphinate moiety considered as to be the analogues of a transition state of the amide bond hydrolysis, have been investigated. The procedures applied to synthesize their direct precursors, namely *N*-benzyloxycarbonyl- α -aminoalkane-phosphonate and *H*-phosphinate monoesters have been described. Particular attention has been devoted to obtaining enantiomerically pure substrates as well as to the control of their optical activity with the use of the appropriate chiral selectors such as cyclodextrins or quinoline alkaloids, and simple chromatographic and spectroscopic methods. The formation of the phosphoramidate bond in various reactions *via* corresponding phosphonochloridates has been studied in some details. Hydrolytic lability of the phosphoramidates obtained has been correlated with their chemical structure and particularly with the presence of their functional groups, and with the solution pH. Exceptional instability of the P–N bond (at pH < 12) in unprotected dipeptide analogues has been proven, which makes their practical application impossible. An interesting reactivity in transesterification of *O*-phenyl phosphoramidates in basic medium has been shown. In the studies on phosphinic peptides, we have concentrated on new methods leading to their electrophilic precursors, i.e. α -substituted acrylates. A convenient method allowing introduction and functionalisation of the P1' substituents of phosphinic dipeptides has been also developed. Additionally, new methods of elongation of the pseudopeptide chain have been tested. The compounds obtained enabled the studies on controlling the activity of such metalloproteases as matrixins or leucine aminopeptidases, and cathepsin C, belonging to the family of cysteine proteases. Combinatorial chemistry and rational design of ligands capable of binding to the appropriate receptors has been used for development of the inhibitors and for the optimisation of their structure.

Spis treści

Wykaz używanych skrótów	4
1. Wprowadzenie	6
1.1. Fosfonamidowe i fosfinowe inhibitory wybranych metaloproteaz jako analogi stanu przejściowego enzymatycznej hydrolizy wiązania amidowego substratów peptydowych	8
1.2. Praktyczne aspekty wykorzystania fosfinopeptydowych inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę	15
1.3. Cel pracy	18
2. Monoestry kwasów <i>N</i> -benzylloksykarbonylo- α -aminoalkanofosfonowych oraz <i>H</i> -fosfinowych jako substraty w syntezie fosforowych analogów peptydów	20
2.1. Synteza <i>N</i> -benzylloksykarbonylo- α -aminoalkanofosfonianów monoalkilowych	22
2.2. Synteza estrów alkilowych kwasów <i>N</i> -benzylloksykarbonylo- α -aminoalkano- <i>H</i> -fosfinowych	24
2.3. Rozdział enancjomerów kwasu <i>N</i> -benzylloksykarbonylo- α -aminofenylometano- <i>H</i> -fosfinowego oraz odpowiedniego fosfonowego estru monofenylowego	26
2.4. Analiza składu enancjomerycznego kwasów <i>N</i> -benzylloksykarbonylo- α -aminoalkano- <i>H</i> -fosfinowych oraz monoestrów <i>N</i> -benzylloksykarbonylo- α -aminoalkanofosfonowych	29
3. Synteza, reaktywność i stabilność fosfonamidowych analogów dipeptydów	34
3.1. Badania dotyczące syntezy związków fosfonamidowych	38
3.2. Transestryfikacja fosfonamidów <i>O</i> -fenylowych jako chemiczny model inhibicji proteaz serynowych	41
3.3. Badania stabilności wiązania fosfonamidowego	43
4. Synteza fosfinopeptydów	52
4.1. α -Podstawione akrylany jako substraty w syntezie fosfinopeptydów	56
4.2. Otrzymywanie fosfinowych analogów dipeptydów oraz modyfikacja ich fragmentu P1'	59
4.3. Wydłużanie sekwencji fosfinodipeptydów	64

5. Badania aktywności peptydów fosfonamidowych i fosfinowych jako inhibitorów wybranych metaloproteaz	67
5.1. Inhibitory metaloproteinaz matriksowych	72
5.2. Racjonalnie projektowane fosforoorganiczne inhibitory leucyloaminopeptydazy	81
5.3. Inne badania dotyczące fosfinopeptydów	90
6. Podsumowanie	92
Literatura	94
Wykaz publikacji objętych rozprawą	104
Phosphoramidate and phosphinate inhibitors of metalloproteases (Summary)	106

Contents

List of abbreviations	4
1. Introduction	6
1.1. Phosphoramidate and phosphinate inhibitors of selected metalloproteases as transition state analogues of enzymatic hydrolysis of the amide bond in peptide substrates	8
1.2. Practical aspects of application of phosphinic inhibitors of angiotensin- converting enzyme	15
1.3. The goal of the work	18
2. Monoesters of <i>N</i> -benzyloxycarbonyl- α -aminoalkanephosphonates and <i>H</i> -phosphinates as substrates for synthesis of phosphorus peptide analogues	20
2.1 Synthesis of monoalkyl <i>N</i> -benzyloxycarbonyl- α -aminoalkanephosphonates ...	22
2.2. Synthesis of alkyl esters of <i>N</i> -benzyloxycarbonyl- α -aminoalkane- - <i>H</i> -phosphinic acids	24
2.3. Separation of the enantiomers of <i>N</i> -benzyloxycarbonyl- α - -aminophenylmethane- <i>H</i> -phosphinic acid and the corresponding monophenyl phosphonate ester	26
2.4. Analysis of enantiomeric composition of <i>N</i> -benzyloxycarbonyl- α -aminoalkane- <i>H</i> -phosphinic acids and <i>N</i> -benzyloxycarbonyl- α -aminoalkanephosphonate monoesters	29
3. Synthesis, reactivity and stability of phosphoramidate dipeptide analogues	34
3.1. Studies on synthesis of phosphoramidate compounds	38
3.2. Transesterification of <i>O</i> -phenyl phosphoramidates as a chemical model of inhibition of serine proteases	41
3.3. Studies on stability of the phosphoramidate bond	43
4. Synthesis of phosphinic peptides	52
4.1. α -Substituted acrylates as substrates for synthesis of phosphinic peptides	56
4.2. Obtaining of phosphinate dipeptide analogues and modification of their P1' fragment	59
4.3. Elongation of the sequence of phosphinic peptides	64

5. Studies on activity of phosphoramidate and phosphinate peptides as inhibitors of selected metalloproteases	67
5.1. Inhibitors of matrix metalloproteinases	72
5.2. Rationally designed phosphoroorganic inhibitors of leucine aminopeptidase	81
5.3. Other studies on phosphinate peptide analogues	90
6. Conclusions	92
References	94
List of author's publications referring to the results presented in the monograph	104
Phosphoramidate and phosphinate inhibitors of metalloproteases (Summary)	106