

ZAKŁAD CHEMII BIOORGANICZNEJ
WYDZIAŁ CHEMICZNY
POLITECHNIKA WROCŁAWSKA

Arkadiusz Białas

Niskocząsteczkowe inhibitory gingipain

Praca wykonana pod kierunkiem
Dr hab. inż. Artura Muchy

Wrocław 2008

1 STUDIA LITERATUROWE 7

1.1 Proteazy jako atrakcyjny cel w projektowaniu antybiotyków nowej generacji.....	8
1.2 Podstawy projektowania inhibitorów proteaz.....	11
1.3 Klasyfikacja inhibitorów, podstawowe pojęcia.....	12
1.4 Omówienie zależności struktura-aktywność dla wybranych inhibitorów proteaz cysteinowych	15
1.4.1 Charakterystyka inhibitorów z ugrupowaniem aldehydowym, porównanie z analogami nitrylowymi	15
1.4.2 Semikarbazony	21
1.4.3 Trifluorometyloketony	22
1.4.4 α -Ketokwasy, α -ketoestry, α -ketoamidy i diketony	23
1.4.5 Inhibitory <i>S</i> -nitrozujące	28
1.4.6 Nitryle	30
1.4.7 Halometyloketony	33
1.4.8 Ketony diazometylowe	36
1.4.9 Ketony acyloksymetylowe	37
1.4.10 Pochodne kwasu epoksybursztynowego	40
1.4.11 Pochodne nienasycone - akceptory typu Michael'a	49
1.4.12 Disiarczki	56
1.4.13 Azapeptydy	57
1.4.14 <i>O</i> -Acylowane pochodne kwasów hydroksamowych	58
1.4.15 Azirydiny i tiirany	64
1.4.16 [1,2,4]-tiadiazole	65
1.5 Charakterystyka gingipain.....	67
1.5.1 Pochodzenie gingipain oraz ich rola w patogenezie i przebiegu paradontozy	67
1.5.2 Ogólny plan budowy RgpB	71
1.5.3 Budowa domeny katalitycznej enzymu	72
1.5.4 Budowa domeny IgSF	73
1.5.6 Miejsce aktywne, podjednostki wiążące substrat i mechanizm katalityczny gingipain R	74
1.5.7 Syntetyczne i naturalne inhibitory gingipain - aktualny stan wiedzy oraz perspektywa dla dalszych badań i zastosowań	78
1.5.7.1 Związki pochodzenia naturalnego hamujące aktywność gingipain.....	79
1.5.7.2 Syntetyczne inhibitory gingipain.....	81

2 CEL PRACY 87

3 BADANIA WŁASNE 89

3.1 Projektowanie inhibitorów gingipain.....	90
3.2 Chlorometyloketony.....	94
3.2.1 Synteza	94

3.2.2 Analiza oddziaływań chlorometyloketonów z RgpB	99
3.2.3 Analiza oddziaływań inhibitorów z Kgp	102
3.3 Akceptory typu Michael'a	108
3.3.1 Założenia, projektowanie	108
3.3.2 Pochodne α,β -nienasycone	109
3.3.2.1 Retrosynteza	109
3.3.2.2 Synteza	110
3.3.2.2.1 <i>N</i> -Acylowane estry lizyny i argininy	110
3.3.2.2.2 Przekształcanie <i>N</i> -acylowanych estrów lizyny i argininy w aldehydowe prekursory α,β -nienasyconych amidów	111
3.3.2.2.2.1 Otrzymywanie <i>N_ε</i> -Cbz- <i>N_α</i> -fenylopropionylolizynalu	111
3.3.2.2.2.2 Otrzymywanie pochodnych aldehydowych poprzez utlenienie odpowiednich alkoholi	111
3.3.2.2.2.3 Otrzymywanie pochodnych aldehydowych poprzez redukcję amidu Weinreb'a	112
3.3.2.2.2.3 Otrzymywanie pochodnych α,β -nienasyconych z <i>N_α</i> -acylowanych Lys(Cbz)-H i Arg(Cbz) ₂ -H	113
3.3.3 Synteza pochodnych γ -okso- α,β -nienasyconych	120
3.3.3.1 Planowanie syntezy	120
3.3.3.2 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych estrów z β -ketoestrów (ścieżka I)	124
3.3.3.3 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych estrów z bromometyloketonów (ścieżka II)	125
3.3.3.4 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych estrów (amidów) w oparciu o reakcję HWE	127
3.3.3.4.1 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych amidów w reakcji HWE z użyciem modyfikowanego reagenta fosforowego (ścieżka III)	127
3.3.3.4.2 Synteza γ -okso- α,β -nienasyconych estrów (amidów) z β -ketofosfonianów – pochodnych <i>N</i> -acylowanych estrów lizyny i argininy (ścieżka IV)	128
3.3.3.4.3 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconego kwasu z odpowiedniego estru	132
3.4 Epoksydy	133
3.4.1 Projektowanie inhibitorów, planowanie syntezy	133
3.4.2 Synteza	135
3.5 Acyloksymetyloketony	140

4 PODSUMOWANIE 143

4.1 Streszczenie otrzymanych wyników	144
--------------------------------------	-----

4.2 Perspektywy	146
-----------------	-----

5 PRZEPISY PREPARATYWNE 149

5.1 Synteza halometyloketonów pochodnych Lys i Arg	153
5.1.1 Otrzymywanie Boc-NHLys(Z)-CHN ₂	153
5.1.2 Otrzymywanie chlorometyloketonów, pochodnych lizyny	153
5.1.3 Wprowadzanie podstawnika P2. Przepisy ogólne stosowane przy acylowaniu Boc-Lys-(Cbz)-CH ₂ Cl chlorkami kwasowymi lub mieszanymi bezwodnikami	154
5.1.3.1 Metoda A, acylowanie chlorkami kwasowymi	154

5.1.3.2	Metoda B, acylowanie metodą mieszanych bezwodników	155
5.1.3.3	Dane analityczne dotyczące <i>N</i> -acylowanych chlorometyloketonowych pochodnych lizyny	155
5.1.4	Przepis ogólny dotyczący usuwania grup ochronnych Cbz z atomów azotu grupy funkcyjnej łańcucha bocznego lizyny oraz grup aminowych reszt P2 i P3 pochodnych lizynowych oraz dane analityczne dla otrzymanych chlorometyloketonów	159
5.1.5	Chlorometyloketony – pochodne argininy	161
5.1.5.1	Otrzymywanie Boc-Arg(Z) ₂ -CHN ₂	161
5.1.5.2	Otrzymywanie chlorometyloketonu argininy, jego <i>N</i> -acylowanych pochodnych oraz ich deprotekcji.....	161
5.1.5.3	Dane analityczne dla chlorometyloketonów – pochodnych argininy.....	162
5.1.6	Bromometyloketony – pochodne lizyny i argininy	164
5.2	Pochodne otrzymywane z <i>N</i> -acylowanych bromometyloketonów lizyny i argininy.....	167
5.2.1	Acyloksymetyloketony	167
5.2.1.1	Fenylopropionylo-Lys(Z)-CH ₂ OC(O)-2,6-di-(trifluorometylo)benzen	167
5.2.1.2	Fenylopropionylo-Arg-(Z) ₂ -CH ₂ OC(O)-2,6-di-(trifluorometylo)benzen	168
5.2.1.3	Fenylopropionylo-Lys-CH ₂ OC(O)-2,6-di(trifluorometylo)benzen	168
5.2.2	Oksirany	169
5.2.2.1	3-Fenylopropionylo-Lys(Z)-oksyran	169
5.2.2.2	Fenylopropionylo-Arg(Z) ₂ -oksyran.....	169
5.3	Synteza α,β -nienasyconych pochodnych lizyny i argininy.....	170
5.3.1	Synteza prekursorów aldehydowych	170
5.3.1.1	Otrzymywanie <i>N</i> -acylowanych estrów lizyny i argininy.....	170
5.3.1.2	3-Fenylopropionylo-Lys(Cbz)-H	174
5.3.1.3	Otrzymywanie aldehydów z odpowiednich alkoholi	175
5.3.1.3.1	Otrzymywanie alkoholi z <i>N</i> -acylowanych estrów	175
5.3.1.3.2	Utlenianie alkoholi do aldehydów	176
5.3.1.4	Otrzymywanie aldehydu poprzez redukcję amidu Weinreb'a	178
5.3.2	Otrzymywanie α,β -nienasyconych amidów z odpowiednich kwasów uzyskanego przez hydrolizę estrów zsyntezowanego w oparciu o reakcję Wittiga	180
5.3.2.1	Ester metylowy kwasu (<i>E</i>)-8- <i>N</i> -benzylloksykarbonyloamino-4-[<i>N</i> -(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego	180
5.3.2.2	Kwas (<i>E</i>)-8- <i>N</i> -benzylloksykarbonyloamino-4-[<i>N</i> -(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowy.....	181
5.3.2.3	Ester metylowy kwasu 7-(2,3-dibenzylloksykarbonyloguanidyno)-4-[<i>N</i> -(3-fenylopropionylo)amino]hept-2-enowego oraz produkt jego odblokowania.....	181
5.3.2.4	Przygotowanie 4- <i>N</i> -benzylloksykarbonylofenylenodiaminy, prekursora reszty P1' amidowych akceptorów typu Michael'a	182
4- <i>N</i> -benzylloksykarbonylofenylenodiaminy	183	
5.3.2.5	<i>N</i> -[4- <i>N'</i> -(benzylloksykarbonylo)fenylo]amid kwasu	184
8-(<i>N</i> -benzylloksykarbonylo)-4-[<i>N</i> -(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego.....	184	
5.3.2.6	<i>N</i> -[4- <i>N'</i> -(benzylloksykarbonyloamino)fenylo]amid kwasu	184
8-(<i>N</i> -benzylloksykarbonylo)-4-[<i>N</i> -(3-fenylopropionylo)amino]-okt-2-enowego.....	184	
5.3.3	Olefinacja w oparciu o reakcję HWE	185
5.3.3.2	<i>N</i> -[4- <i>N'</i> -(benzylloksykarbonylo)amino]fenyloamid kwasu	186
8-(<i>N</i> -benzylloksykarbonylo)-4-[<i>N</i> -(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego	186	
5.3.3.3	<i>N</i> -[4- <i>N'</i> -(benzylloksykarbonylo)amino]fenyloamid kwasu	186
8-benzylloksykarbonyloamino-4-{{4-(<i>N</i> -benzylloksykarbonyloaminometylo)fenylo-acetylo}amino}okt-2-enowego	186	
5.3.3.4	<i>N</i> -[4- <i>N'</i> -(benzylloksykarbonylo)amino]fenyloamid kwasu	187
8-(<i>N</i> -benzylloksykarbonylo)-4-(<i>N</i> -benzoiloamino)okt-2-enowego.....	187	
5.3.3.5	<i>N</i> -[4- <i>N'</i> -(benzylloksykarbonylo)fenylo]amid kwasu	188
7-(2,3-dibenzylloksykarbonyloguanidyno)-4-[<i>N</i> -(3-fenylopropionylo)amino]hept-2-enowego.....	188	
5.3.4	Odblokowanie końcowych grup aminowych otrzymanych pochodnych α,β -nienasyconych – dane analityczne	188
5.3.4.1	Ester metylowy kwasu (<i>E</i>)-8-amino-4-[(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego... ..	189

5.3.4.2 <i>N</i> -(4-aminofenylo)amid kwasu (<i>E</i>)-8-amino-4-[(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego.....	189
5.3.4.3 <i>N</i> -(4-aminofenylo)amid kwasu (<i>E</i>)-8-amino-4- 189	189
{[4-(aminometylo)fenyloacetylo]amino}okt-2-enowego.....	189
5.3.4.4 Produkt (39) wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji <i>N</i> -(4-aminofenylo)amidu kwasu 8-amino-4-(<i>N</i> -benzoiloamino)okt-2-enowego	190
5.3.4.5 <i>N</i> -(4-Aminofenylo)amid kwasu (<i>E</i>)-7-guanidyno-4-[(3-fenylopropionylo)amino]hept-2-enowego (38a) oraz produkt jego wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.....	190
5.4 Synteza pochodnych γ-okso-α,β-nienasyconych	191
5.4.1 Addycja prekursora reszty P1' do siliowego eteru enolowego	191
5.4.2 Reakcja HWE między oksoaldehydem i karboanionem otrzymanywym z fosfonoamidowego prekursora reszty P1'	192
5.4.2.1 Przygotowanie acetonowego roztworu dimetylo-dioksyranu	192
5.4.2.2 3-Fenylopropionylo-Lys(Cbz)-CHN ₂	193
5.4.2.3 7- <i>N</i> -benzyloksykarbonyloamino-2-okso-3-[(3-fenylopropionylo)amino]-heptanal	194
5.4.3 Reakcja HWE między karboanionem otrzymanywym z β -ketofosfonianu i oksoaldehydowym prekursorem reszty P1'	194
[4-(<i>N</i> -benzyloksykarbonyloamino)fenyloamino]etanal	195
5.4.3.7 6-(2,3-dibenzyloksykarbonyloguanidyno)-2-okso-3-.....	197
(3-fenylpropanoamido)heksylofosfonian dimetylu.....	197
5.4.4 Reakcja HWE między karboanionem otrzymanywym z β -ketofosfonianu i glioksalanem etylu	198
5.4.4.1 Ester etylowy kwasu 9- <i>N</i> -benzyloksykarbonyloamino-4-okso-5-(<i>N</i> -(3-fenylopropionylo)amino)non-2-enowego	198
5.4.4.2 Ester etylowy kwasu 5-[<i>N</i> -(benzoilo)amino]-9- <i>N</i> -benzyloksykarbonyloamino-4-okso-non-2-enowego	199
5.4.4.3 Ester etylowy kwasu 8-(2,3-dibenzyloksykarbonyloguanidyno)-4-oxo-5-(<i>N</i> -(3-fenylopropionylo)amino)okt-2-enowego.....	200
5.4.4.4 Usuwanie grup ochronnych z otrzymanych γ -okso- α,β -nienasyconych estrów.....	201

6 WYKAZ SKRÓTÓW, AKRONIMÓW I OZNACZEŃ STOSOWANYCH W TEKŚCIE 203

6.1 Enzymy i inhibitory:	203
6.2 Kinetyka enzymatyczna	203
6.3 Nazwy chemiczne	203

7 LITERATURA 205

1 Studia literaturowe

1.1 Proteazy jako atrakcyjny cel w projektowaniu antybiotyków nowej generacji

1.2 Podstawy projektowania inhibitorów proteaz

1.3 Klasyfikacja inhibitorów, podstawowe pojęcia

1.4 Omówienie zależności struktura-aktywność dla wybranych inhibitorów proteaz cysteinowych...

1.4.1 Charakterystyka inhibitorów z ugrupowaniem aldehydowym, porównanie z analogami nitrylowymi

1.4.2 Semikarbazony

1.4.3 Trifluorometyloketony

1.4.4 α -Ketokwasy, α -ketoestry, α -ketoamidy i diketony

1.4.5 Inhibitory S-nitrozujące

1.4.6 Nitryle

1.4.7 Halometyloketony

1.4.8 Ketony diazometylowe

1.4.9 Ketony acyloksymetylowe

1.4.10 Pochodne kwasu epoksybursztynowego

1.4.11 Pochodne nienasycone - akceptory typu Michael'a

1.4.12 Disiarczki

1.4.13 Azapeptydy

1.4.14 O-Acylowane pochodne kwasów hydroksamowych

1.4.15 Azirydiny i tiryany

1.4.16 [1,2,4]-tiadiazole

1.5 Charakterystyka gingipain

1.5.1 Pochodzenie gingipain oraz ich rola w patogenezie i przebiegu paradontozy

1.5.2 Ogólny plan budowy RgpB

1.5.3 Budowa domeny katalitycznej enzymu

1.5.4 Budowa domeny IgSF

1.5.6 Miejsce aktywne, podjednostki wiążące substrat i mechanizm katalityczny gingipain R

1.5.7 Syntetyczne i naturalne inhibitory gingipain - aktualny stan wiedzy oraz perspektywa dla dalszych badań i zastosowań

1.5.7.1 Związki pochodzenia naturalnego hamujące aktywność gingipain

1.5.7.2 Syntetyczne inhibitory gingipain

1.1 Proteazy jako atrakcyjny cel w projektowaniu antybiotyków nowej generacji

Hydroliza wiązania peptydowego jest jedną z podstawowych reakcji zachodzących w trakcie przemian biochemicznych we wszystkich organizmach żywych. Liczba ponad 560 opisanych przedstawicieli proteaz – najliczniejszej grupy spośród wszystkich scharakteryzowanych dotychczas białek - wyraźnie wskazuje na ich powszechność w świecie istot żywych i sugeruje ich istotną rolę w metabolizmie wszystkich organizmów.¹ Zaangażowanie proteaz w podstawowe procesy stwierdza się już u wirusów - form przejściowych między organiczną materią nieożywioną i organizmami żywymi, a ich kluczowe znaczenie dla życia organizmów komórkowych, zaczynając od bakterii i sinic, poprzez pierwotniaki i grzyby, na roślinach i zwierzętach kończąc, w świetle współczesnej wiedzy nie budzi wątpliwości.² Zainteresowanie tymi makrocząsteczkami zaowocowało wieloma zastosowaniami w dziedzinie biotechnologii, a także przyczyniło się do opracowania leków działających jako inhibitory proteaz.²

Należy jednak zaznaczyć, że proteazy pochodzące z różnych źródeł, jako receptory dla racjonalnie zaprojektowanych inhibitorów spotkały się ze zróżnicowanym zainteresowaniem badaczy. Zastanawiająca jest niewielka liczba doniesień dotyczących projektowania inhibitorów proteaz bakteryjnych.^{3,4} Białka te, ze względu na podstawowe funkcje pełnione w komórce, bądź w środowisku bytowania mikroorganizmu, są atrakcyjnymi celami dla opracowywania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób wywoływanych przez drobnoustroje.^{2,3} Koncepcja profilaktyki i leczenia zakażeń bakteryjnych przy pomocy inhibitorów proteaz opiera się na założeniu, że inaktywacja tych białek, pełniących w przypadku wielu schorzeń rolę czynników etiologicznych, prowadzi do śmierci drobnoustroju. Wynika to z faktu, że w bardzo wielu przypadkach mechanizmy infekcji bakteryjnej, proliferacja i przeżywanie patogenu w organizmie bazują na działaniu wyspecjalizowanych enzymów proteolitycznych. Uczestniczą one w kolonizacji i degradowaniu tkanek, z których mikroorganizm pozyskuje składniki pokarmowe niezbędne dla rozwoju i rozprzestrzeniania.^{3,4} Hamują odpowiedź immunologiczną, zaburzają podstawowe procesy fizjologiczne poprzez modyfikowanie aktywności aktywatorów i/lub inhibitorów w różnych kaskadowych procesach biochemicznych, degradują powierzchniowe receptory komórkowe oraz inhibitory proteaz produkowane przez komórki gospodarza.³⁻⁶ Znamienne jest, że produkowane przez zainfekowany organizm

inhibitory proteaz serynowych (serpiny) wpływają tylko w niewielkim stopniu na aktywność enzymów bakteryjnych.^{2,3}

Z przytoczonego powyżej opisu wynika, że proteazy są niezbędne dla podtrzymywania podstawowych funkcji życiowych komórki bakterii. Stały się również podstawowymi czynnikami umożliwiającymi im prowadzenie pasożytniczego trybu życia. Ponieważ zaburzenie funkcjonowania tych białek prowadzi do upośledzenia funkcji życiowych pasożyta, a nawet do jego eliminacji, proteazy bakteryjne są atrakcyjnym celem dla projektowania nowych antybiotyków o bardzo ściśle ukierunkowanym działaniu.³ Rozwijanie tego aspektu chemii medycznej jest coraz bardziej uzasadnione w sytuacji, kiedy w praktyce klinicznej obserwuje się narastającą oporność na tradycyjne antybiotyki o szerokim spektrum działania.⁷ Uzyskiwanie oporności na antybiotyki typu inhibitorów proteaz wydaje się o tyle utrudnione, że lek wpływałby wybiórczo na określony szczep bakteryjny, ze względu na bardzo wyspecjalizowany mechanizm działania.

Molekularne podstawy współcześnie stosowanych terapii antybiotykowych zasadzają się na współdzielonych przez wiele typów bakterii mechanizmach syntezy ściany komórkowej (penicyliny, cefalosporyny), transkrypcji, replikacji (fluorochinolony - blokowanie gyrazy), czy translacji (makrolidy, linkozamidy – zaburzenie funkcjonowania podjednostki 50S rybosomów bakteryjnych, aminoglikozydy, tetracykliny - zaburzenie funkcjonowania podjednostki 30S rybosomów bakteryjnych).⁸ Stąd wypływa możliwość skutecznego dziedziczenia oporności między szczepami. Jeśli farmakoterapia wykorzystywałaby mechanizm obecny tylko u przedstawicieli określonego gatunku, oporność krzyżowa nie powinna mieć miejsca.

Wiele spośród stosowanych antybiotyków wywołuje liczne skutki uboczne, w tym upośledzenie funkcji wielu narządów wewnętrznych i uczulenia.⁸ Opracowanie nowych związków o ukierunkowanym działaniu i niskiej toksyczności to kolejny atut takiego podejścia. Podawanie leku, który ze względu na wysoką specyficzność nie narusza naturalnej flory bakteryjnej organizmu, nie narażałoby pacjenta na zagrożenia związane z zakażeniami wtórnymi, na przykład w układzie pokarmowym.

Uwzględniając aktualny stan wiedzy w zakresie inhibicji proteaz bakteryjnych funkcjonujących jako czynniki zjadliwości, których eliminowanie wydaje się obiecującym alternatywnym sposobem walki z mikroorganizmami chorobotwórczymi, można stwierdzić, że jest to obszar badawczy wciąż niewystarczająco eksplorowany.

Z punktu widzenia zadań badawczych podejmowanych w trakcie realizacji tematu niniejszej pracy, konieczne były studia literaturowe dotyczące podstaw pozyskiwania nowych inhibitorów, w szczególności ligandów inaktywujących proteazy cysteinowe. Dlatego najwięcej uwagi w teoretycznej części dysertacji poświęcę molekularnym podstawom strategii stosowanych przy projektowaniu potencjalnych leków, które wywołują efekt terapeutyczny poprzez oddziaływanie z docelowym enzymem.

Projektując leki antybakteryjne skierowane przeciwko enzymom proteolitycznym wytwarzanym przez mikroorganizmy można odwoływać się do wiedzy z zakresu inhibicji wszystkich scharakteryzowanych proteaz – wirusowych, bakteryjnych, izolowanych z grzybów, roślinnych i zwierzęcych. Wyniki uzyskiwane na tym polu, w szczególności, jeśli dotyczą one zależności między strukturą i aktywnością, mają często charakter uniwersalny, przynajmniej w obrębie tej samej rodziny proteaz. Wynika to z podobieństwa strukturalnego docelowych enzymów, analogicznego sposobu ich fałdowania oraz wspólnych mechanizmów katalitycznych i inhibicji. Dlatego wiele opublikowanych rozwiązań wykorzystanych przy projektowaniu inhibitorów, które okazały się aktywne *in vitro* i/lub *in vivo*, można adaptować przy otrzymywaniu związków skierowanych przeciwko nowym celom. Najwięcej informacji dostarczają prace opisujące inhibitory proteaz, które uczestniczą w patogenezie poważnych schorzeń u ludzi. Jest to zupełnie zrozumiałe biorąc pod uwagę fakt, że właśnie dla tych proteaz prowadzi się najwięcej badań w poszukiwaniu nowych strategii terapeutycznych.⁹⁻¹¹ W części teoretycznej niniejszej dysertacji odwołuję się zarówno do starszych opracowań, które kompleksowo omawiają molekularne podstawy projektowania inhibitorów i mechanizmy ich działania, jak i najnowszej literatury, która uaktualnia te dane w oparciu o najświeższe doniesienia zarówno w zakresie chemii jak i wdrożeń klinicznych znanych oraz nowo opracowanych inhibitorów. Ponieważ temat niniejszej dysertacji dotyczy inhibitorów gingipain, ogólne zagadnienia dotyczące projektowania i otrzymywania związków hamujących proteazy zostały ograniczone do informacji niezbędnych przy dyskusji przedmiotu badań wykonanych w ramach tej pracy. Szczególnie dokładnie zamierzam natomiast omówić problematykę inhibitorów proteaz cysteinowych, do których należą gingipainy.

1.2 Podstawy projektowania inhibitorów proteaz

Projektowanie inhibitorów proteaz w oparciu o strukturę docelowego enzymu wpisuje się w szerszy aspekt opracowywania substancji biologicznie czynnych na bazie zależności struktura-aktywność. Takie podejście staje się dzisiaj podstawową strategią stosowaną zarówno w ośrodkach akademickich jak i w przemyśle farmaceutycznym jako integralna część procesu odkrywania nowych leków.¹² Dzieje się tak dzięki ewoluowaniu wielu dziedzin biologii oraz technik analitycznych. Powodzenie projektu badania ludzkiego genomu, postępy w proteomice i genomice strukturalnej oraz rozwój bioinformatyki powodują, że racjonalne projektowanie leku w oparciu o strukturę docelowego receptora czy enzymu jest coraz bardziej skuteczne, wiarygodne i opłacalne. Znacznie łatwiej znaleźć atrakcyjne cele dla potencjalnych leków dzięki systematycznie tworzonym bioinformatycznym bazom danych. Geny kodujące te cele mogą być łatwo klonowane, a ich produkty białkowe wyizolowane i dokładnie oczyszczone. Udoskonalenia wysokorozdzielczej krystalografii takie jak zautomatyzowanie wszystkich etapów analizy czy zwiększenie intensywności promieniowania synchrotronów skracają czas potrzebny do określenia struktury badanego obiektu. Nowe rozwiązania technologiczne stosowane obecnie przy produkcji sond i magnesów do spektrometrów NMR doprowadziły do zwiększenia czułości aparatury i poprawy rozdzielczości widm rejestrowanych przy jej pomocy. Dzięki poprawie parametrów technicznych spektrometrów opracowano szereg nowych technik badawczych w dziedzinie spektroskopii rezonansu magnetycznego, których z powodzeniem używa się do określania struktury makrocząsteczek oraz w analizie oddziaływań ligand-receptor.^{13,14} Wreszcie dostęp do szybszych komputerów i relatywnie coraz tańszych klastrów komputerowych znacznie przyspiesza identyfikację i ocenę potencjalnych struktur wiodących *in silico*.

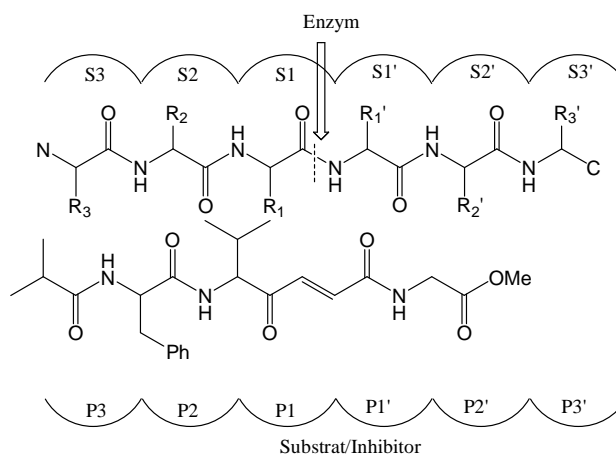
Projektowanie w oparciu o strukturę ma sens jako integralna część całego procesu opracowania potencjalnego leku. W połączeniu z chemią kombinatoryczną pozwala na równoległą syntezę bibliotek związków wiodących, aktywnych wobec sprecyzowanego celu. Należy podkreślić, że znalezione w taki sposób struktury wiodące nie są lekami, a raczej substancjami o wysokim, co najmniej mikromolarnym powinowactwie do docelowego enzymu czy receptora.¹⁵ Związki uznane za struktury wiodące muszą być poddane opracowaniu farmakologicznemu, które ma za zadanie poprawić ich parametry farmakokinetyczne, biodostępność, współczynnik przenikania przez błony biologiczne,

a także gwarantować bierność wobec niespecyficznych celów. Powinny również przejść pozytywnie testy fizjologiczne i toksykologiczne, w których muszą wykazać aktywność wystarczającą do wywołania określonego efektu terapeutycznego, bez ryzyka wystąpienia skutków ubocznych. Dopiero wówczas trafiają do właściwych badań klinicznych, które kwalifikują je jako produkt handlowy do stosowania w leczeniu.

1.3 Klasyfikacja inhibitorów, podstawowe pojęcia

Celem bardziej czytelnego przedstawienia podstawowych zagadnień związanych z opracowywaniem nowych inhibitorów warto odwołać się do sformalizowanej terminologii stosowanej w tej dziedzinie, pozwalającej na usystematyzowanie informacji o konstrukcji ligandów enzymów w powiązaniu z mechanizmem ich działania. Do opisu specyficzności proteaz powszechnie używa się nomenklatury zastosowanej pierwotnie przez Bergera i Schechtera,¹⁶ opartej na modelu, w którym centrum katalityczne enzymu sąsiaduje z wnękami wiążącymi, których budowa decyduje o sposobie wiązania oraz rodzaju preferowanych ligandów. Wnęki te opisywane są literą S i numerowane: S1, S2,..., Sn, zaczynając od centrum katalitycznego i kierując się w stronę N-końca oraz S1', S2',..., Sn' w kierunku C-końca. Reszty liganda leżące po stronie aminowej hydrolizowanego wiązania, wiązane przez kieszenie wiążące Sn, numeruje się odpowiednio P1, P2,..., Pn, a reszty wiązane przez wnęki Sn' - P1', P2',..., Pn' (rysunek 1.1).

Rysunek 1.1: Wyjaśnienie powszechnie stosowanego nazewnictwa wnęk wiążących enzymu i odpowiadających im reszt ligandów: przykładowego inhibitora i substratu; Miejsce hydrolizy wiązania peptydowego wskazano strzałką.



W opisie inhibitorów obok przedstawienia planu ich budowy kolejnym ważnym elementem jest mechanizm przebiegającej z ich udziałem inhibicji. Stosowana dzisiaj powszechnie klasyfikacja inhibitorów ze względu na mechanizm działania

zaproponowana w 1992 przez Krantz'a ma oczywiście charakter formalny.¹⁸ Często zaszeregowanie związku hamującego enzym do określonej grupy jest trudne, ze względu na nie zawsze ostre granice podziału wyznaczane przez definicje stosowane w tej klasyfikacji. Niemniej wprowadzenie pewnych porządkujących pojęć z zakresu inhibicji enzymów ułatwia opisywanie inhibitorów oraz umożliwia ujednoczenie ich charakterystyk.

Po pierwsze można wziąć pod uwagę miejsce działania inhibitora. To kryterium pozwala na rozróżnienie między inhibitorami wiążącymi się z miejscem aktywnym enzymu a efektorami allosterycznymi, które wiążą się poza miejscem aktywnym.

W zależności od charakteru oddziaływania inhibitora z enzymem można dokonać ich podziału na kowalencyjne i niekowalencyjne oraz odwracalne i nieodwracalne. O inhibicji odwracalnej mówimy wtedy, gdy enzym odzyskuje aktywność wskutek zmniejszenia stężenia inhibitora w środowisku działania enzymu poprzez rozcieńczenie, dializę lub filtrację żelową. W przypadku inhibicji nieodwracalnej zmniejszenie stężenia inhibitora nie prowadzi do odzyskania aktywności przez enzym. Inhibitorami odwracalnymi są najczęściej związki oddziałujące niekowalencyjnie z miejscem aktywnym. Należy jednak zaznaczyć, że inhibitory wiążące się z resztami miejsca aktywnego wiązaniem kowalencyjnym labilnym w warunkach hydrolizy (aldehydy, nityle) również należy uznać za odwracalne. Czasami wykonanie pomiarów zaniku aktywności enzymatycznej w obecności inhibitorów, które nie posiadają fragmentów mogących tworzyć wiązanie kowalencyjne z enzymem sugeruje inhibicję nieodwracalną. Mówimy w takim przypadku o inhibitorach ściśle wiążących się, które ze względu na wysokie powinowactwo do enzymu bardzo wolno dysocjują z kompleksu enzym-inhibitor.

Interesującą grupę stanowią inhibitory wolno wiążące się. W grupie tej znajdziemy zarówno inhibitory odwracalne, jak i nieodwracalne. Zanik aktywności enzymu przebiegający z udziałem tych pierwszych jest niezwykle powolny ze względu na czas potrzebny na zmiany konformacyjne konieczne dla utworzenia kompleksu z enzymem. Wolnowiązące się inhibitory nieodwracalne reagują z enzymem poprzez utworzenie niekowalencyjnego stanu przejściowego, co prowadzi do utraty aktywności przez enzym.

Analiza zmian strukturalnych w enzymie wiążącym inhibitor i samego inhibitora pozwoliła na opracowanie jeszcze bardziej szczegółowego podziału związanego z mechanizmem inhibicji. W obrębie wyróżnionych w tej klasyfikacji dwóch grup

inhibitorów kowalencyjnych i niekowalencyjnych wydzielono po dwie podgrupy. Inhibitory niekowalencyjne mogą być analogami substratu. W takim przypadku są odwracalnie i szybko wiązane konkurując z substratem o miejsce aktywne. Kompleks inhibitora z enzymem jest нефункциональный. Do drugiej podgrupy zaliczono inhibitory ściśle wiążące się, analogi stanu przejściowego, które strukturą przypominają wysokoenergetyczne produkty tworzące się w stanie przejściowym hydrolizy wiązania amidowego oraz inhibitory wiążące się jednocześnie z kilkoma domenami blokowanego enzymu.

Wśród inhibitorów kowalencyjnych pierwszą podgrupę stanowią inhibitory, których działanie opiera się na mechanizmie katalitycznym. Podzielono je na cztery typy.

Analogi stanu przejściowego – związanie takiego inhibitora prowadzi do produktu analogicznego do stanu przejściowego, w efekcie enzym całkowicie traci aktywność. Tak działają m.in. aldehydowe pochodne peptydów.

Inhibitory aktywowane przez enzym, nazywane także samobójczymi lub „końmi trojańskimi” – reagują one z proteazą dając produkt przejściowy ulegający następnie kolejnej reakcji, która nie zachodzi w trakcie normalnie przebiegającego procesu katalitycznego.

Inhibitory „dead-end” – wiążą się kowalencyjnie do enzymu lub tworzą z nim trwałe kompleksy.

Substraty zastępcze – są wiązane kowalencyjnie przez enzym, a następnie ulegają reakcji enzymatycznej normalną drogą z wytworzeniem produktu, przy czym reakcja ta przebiega bardzo wolno.

Druga podgrupa obejmuje związki, które działają jak substancje znakujące wskutek powinowactwa do enzymu. Posiadają one grupy funkcyjne, które reagują z resztami miejsca aktywnego tworząc kompleksy nie dające się rozdzielić poprzez filtrację żelową, czy dializę. Reakcja prowadząca do znakowania nie jest specyficzna i nie ma związku z normalnie przebiegającym procesem katalizy. Znakowanie może być dwójakiego rodzaju. Po pierwsze może ono dotyczyć dowolnych cząsteczek chemicznych zawierających ugrupowania, z którymi inhibitor reaguje w enzymie. Tak działają reaktywne substancje znakujące, ang. „Chemically Reactive Affinity Label”, na przykład chlorometyloketony. Po drugie, znakowanie może ograniczać się tylko do grup funkcyjnych obecnych w cząsteczce enzymu. Inhibitory działające według tego mechanizmu nie wykazują aktywności względem cząsteczek, które nie są enzymami, ang. „Quiescent Affinity Labels”, na przykład acyloksymetyloketony.

Przebieg inhibicji zgodnie z jednym z opisanych wyżej mechanizmów jest bezpośrednią konsekwencją chemicznych własności inhibitora wynikających z jego struktury, która decyduje o sposobie oddziaływania z docelowym enzymem.

1.4 Omówienie zależności struktura-aktywność dla wybranych inhibitorów proteaz cysteinowych

Większość opisanych inhibitorów proteaz cysteinowych posiada ten sam schemat budowy, który wynika z dwóch podstawowych kryteriów stosowanych przy ich projektowaniu – komplementarności z resztami wnęk wiążących oraz zdolności do chemicznej modyfikacji centrum aktywnego. Komplementarność do miejsca aktywnego osiąga się poprzez wprowadzenie do struktury inhibitora fragmentu zbudowanego z reszt mogących tworzyć sieć wiązań (mostki solne, wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe) z resztami eksponowanymi we wnękach wiążących enzymu. Określa się go jako fragment odpowiedzialny za rozpoznanie przez enzym.^{9,10} Najczęściej jest to fragment peptydowy o sekwencji zgodnej z sekwencją aminokwasów w substracie charakteryzujący się wysokim powinowactwem do enzymu. Modyfikacja centrum aktywnego enzymu prowadząca do jego inaktywacji osiągana jest przez wbudowanie do struktury inhibitora reaktywnego ugrupowania, które po związaniu takiego liganda przez enzym modyfikuje wybraną resztę aminokwasową uniemożliwiając przebieg procesu katalitycznego. W przypadku inhibitorów proteaz cysteinowych jest to ugrupowanie elektrofilowe, podatne na atak nukleofilowego atomu siarki katalitycznej reszty cysteiny. W języku angielskim te fragmenty inhibitorów określa się militarnym terminem „warheads”, czyli głowice bojowe, co dobrze oddaje charakter pełnionych przez nie funkcji. Szczegółowe omówienie poszczególnych grup funkcyjnych wprowadzanych do struktury inhibitorów proteaz cysteinowych w takiej roli, z uwzględnieniem mechanizmu inhibicji oraz analizy ograniczeń ich stosowania, zostanie przedstawione w kolejnych podrozdziałach.

1.4.1 Charakterystyka inhibitorów z ugrupowaniem aldehydowym, porównanie z analogami nitrylowymi

Postulowany tetraedryczny stan przejściowy zaproponowany jako element mechanizmu katalitycznego proteaz cysteinowych i serynowych pozwalał zakładać, że reaktywne związki karbonylowe mogłyby funkcjonować jako analogi stanu

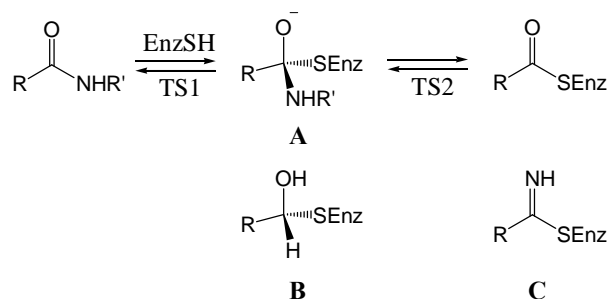
przejściowego. To założenie, obok doniesień o inhibitorowej aktywności aldehydowych pochodnych peptydów (leupeptyny, chymostatyny, antypainy oraz β -MAPI) wyizolowanych z różnych szczepów *Streptomyces* dało podstawy do zainteresowania się tą grupą związków w aspekcie przygotowania nowych struktur wiodących. Pewną niedogodnością jest ograniczona selektywność tych pochodnych, związana z reaktywnością względem różnorodnych nukleofili, głównie tiolowych i hydroksylowych. Własnością tą do pewnego stopnia można sterować poprzez modyfikacje na poziomie sekwencji aminokwasów rozpoznawanej przez enzym, ograniczając możliwość niespecyficznego wiązania inhibitora.

Dodatkowym problemem, który pojawia się w warunkach fizjologicznych, jest możliwość utlenienia grupy aldehydowej do znacznie mniej reaktywnego ugrupowania karboksylowego.

Aldehydowe pochodne peptydów są odwracalnymi inhibitorami wiążącymi się kowalencyjnie z enzymem. Ze względu na mechanizm działania zalicza się je do analogów stanu przejściowego. Strukturę postulowanego, tetraedrycznego hemitioacetalu, tworzącego się w reakcji addycji grupy tiolowej cysteiny do karbonylowego atomu węgla potwierdzono metodami spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego badając inhibicję papainy.^{18,19}

W późniejszej pracy opisującej eksperymenty z wykorzystaniem papainy zmodyfikowanej poprzez ukierunkowaną mutagenezę w pozycji Gln19 pośrednio wykazano, że mechanizm inhibicji związkami z tej klasy jest bardziej złożony.²⁰

Poprzez wprowadzenie modyfikacji we wnęce wiążącej oksyanion określano rolę reszty 19 na etapie formowania się nietrwałego tetraedrycznego stanu przejściowego, który poprzedza tworzenie acyloenzymu (schemat 1.1, A).



Schemat 1.1: Porównanie struktur produktu przejściowego w reakcji proteaz cysteinowych z substratem (A) oraz inhibitorami z reaktywnym ugrupowaniem CHO (B) i CN (C). „TS” stan przejściowy

W badaniach porównano wpływ mutacji Gln19Glu na wiązanie przez enzym dwóch klas odwracalnych inhibitorów kowalencyjnych – pochodnych aldehydowych i nitrylowych oraz peptydowych substratów. Zamiana reszty Gln na Glu prowadzi do destabilizacji stanu przejściowego zarówno w katalizowanej przez papainę hydrolizie substratu jak i w przypadku reakcji enzymu z inhibitorem nitrylowym, co manifestuje się między innymi wzrostem wartości stałej K_i . Wpływ mutacji na wiązanie peptydyloaldehydów jest odwrotny. Jako skutek rejestruje się minimalny wzrost powinowactwa. Obserwacje te tłumaczy się różnicami mechanizmów inhibicji w obu przypadkach. Tioimidowe produkty w reakcji reszty cysteiny z ugrupowaniem cyjanowym są analogami posiadającego geometrię trygonalną acyloenzymu, kowalencyjnego produktu reakcji enzymu z peptydowym substratem. W reakcji inhibitorów aldehydowych z enzymem tworzy się natomiast tetraedryczny hemitioacetal, w którym atom węgla wiążący katalityczną resztę cysteiny ma hybrydyzację sp^3 . Z powyższego wynika, że peptydyloaldehydy reagują z enzymem analogicznie do substratu, a peptydylonitryle powinny formować z enzymem addukt zbliżony geometrią do acyloenzymu. Niemniej dane eksperymentalne sugerują, że w przypadku obu typów ligandów oraz substratu stan przejściowy podczas reakcji z enzymem musi być podobny. Po pierwsze, wskazuje na to wysoka korelacja stałych K_i i k_{kat}/K_m otrzymane dla peptydowych substratów oraz ich nitrylowych analogów w reakcji z papainą.^{21,22} Po drugie, na przykładzie jedenastu par analogów nitrylowych i aldehydowych pokazano liniową korelację wyznaczonych wartości energii swobodnych wiązania z enzymem, co również może przemawiać za podobnym mechanizmem reakcji w obu przypadkach.²¹ Mimo tego, różnica w geometrii hemitioacetali oraz tioamidów, a także odmienny wpływ zmiany w obrębie wnęki wiążącej oksyanion na wiązanie tych ligandów oraz substratu przez papainę nasuwa pewne wątpliwości w kwestii przebiegu reakcji z proteazą przez analogiczny tetraedryczny stan przejściowy.

Różne zachowanie aldehydowych ligandów oraz substratu przypisywano początkowo odmiennym oddziaływaniom elektrostatycznym z wnęką wiążącą oksyanion. Karbonylowy atom tlenu w hydrolizowanym wiązaniu peptydowym w substracie w stanie przejściowym wykazuje ładunek ujemny, podczas gdy w przypadku inhibitora addukt ma charakter obojętny.²³ Niemniej, tioimid tworzący się w reakcji z inhibitorami nitrylowymi również nie posiada ładunku, a jest stabilizowany przez resztę Gln19. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że podobnie jak w przypadku

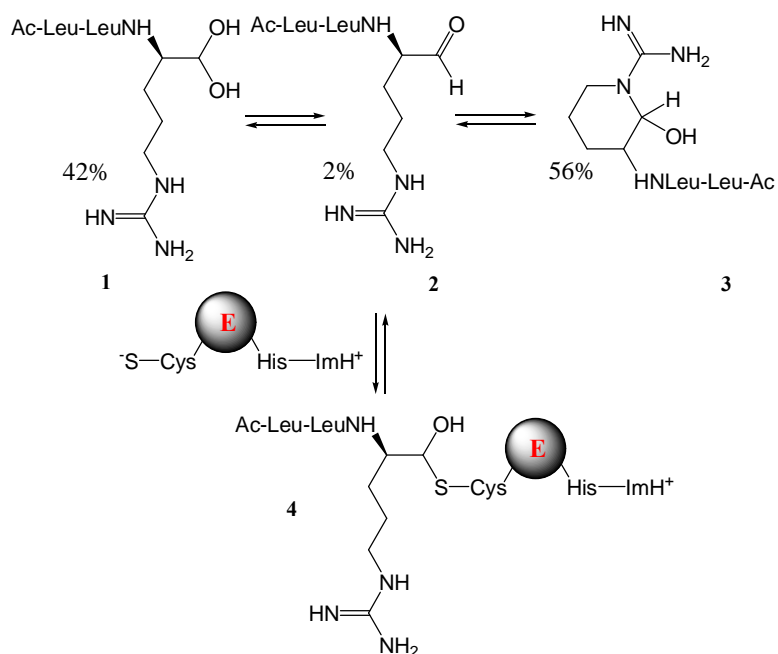
proteaz serynowych możliwe są dwa sposoby wiązania liganda aldehydowego. Pierwszy prowadzi do ustawienia ugrupowania hydroksylogowego hemiacetalu poza wnękę wiążącą oksyanion, w odległości wiązania wodorowego od atomu azotu stabilizującej reszty His. W sytuacji wiązania drugim sposobem, atom tlenu hemiacetalu znajduje się we wnętrzu.²⁴ Ze względu na podobieństwo mechanizmów katalitycznych proteaz cysteinowych i serynowych założono możliwość przyjmowania dwóch konfiguracji również przez kompleks inhibitora i proteazy tiolowej. Chociaż nie udowodniono tej hipotezy metodami krystalograficznymi, być może z powodu trudności z doбором warunków krystalizacji dla kompleksu z grupą hydroksylogową wystającą poza wnękę oksyanionu, całkowicie jej nie odrzucono. Wyniki uzyskane z udziałem zmutowanej papainy pośrednio wskazują na możliwość kilkietapowego przebiegu reakcji i tworzenia kompleksów o dwóch konfiguracjach. Zgodnie z tym mechanizmem, w etapie decydującym o szybkości reakcji powstawałby kompleks niestabilizowany przez wnękę wiążącą oksyanion.

Pochodne nitrylowe wobec zmutowanego enzymu zachowywały się podobnie jak substrat. Wskazywały na to profile aktywności inhibitorów w zależności od pH, które generalnie dobrze korelowały z odpowiadającymi profilami wpływu pH na kinetykę hydrolizy substratu. Takie same wnioski nasuwają się po analizie wpływu mutacji na tendencje zmian wartości K_i określonych dla inhibitorów oraz k_{cat}/K_m dla substratów, które również wykazują wyraźną zbieżność.²⁰

Projektując pochodne aldehydowe jako inhibitory proteaz cysteinowych przewidywano, że jako analogii teraedrycznego stanu przejściowego w hydrolizie substratu powinna cechować je wysoka aktywność. Uwzględniając wartości stałych tworzenia kompleksów anionów tiolanowych prostych tioli z odpowiadającymi sobie inhibitorami nitrylowymi i aldehydowymi stwierdzono 260 razy większe powinowactwo badanych związków siarki do aldehydów, co wynika z wyższej reaktywności karbonylogowego atomu węgla. Te same inhibitory w reakcji z papainą wykazywały znacznie mniejsze różnice. Wyznaczone K_i były już tylko 21 razy mniejsze dla pochodnych aldehydowych. Dowodzi to stabilizującego wpływu otoczenia w centrum aktywnym enzymu. Biorąc pod uwagę fakt, że stabilizacja w przypadku ligandów nitrylowych jest zaburzona poprzez mutację wnęki wiążącej oksyanion, zakłada się istotny udział reszty Gln19 we wzajemnym oddziaływaniu inhibitorów nitrylowych z centrum aktywnym. Wydaje się jednak, że za efekt stabilizacyjny promujący katalizę odpowiada przede wszystkim oddziaływanie części peptydowej

ligandów z centrum aktywnym w kompleksie Michaelis-Menten, które znacznie obniża entropię tworzenia połączenia kowalencyjnego z enzymem. Świadczy o tym liniowa korelacja między stałymi K_i oraz k_{cat}/K_m dla inhibitorów i substratów o różnej geometrii oraz hybrydyzacji atomu węgla uczestniczącego w reakcji. Jednocześnie wysoka korelacja tych parametrów dla różnych ligandów o odmiennych geometriach stanów przejściowych sugeruje, że nie powinno się jej traktować jako wyznacznika ścisłego podobieństwa mechanizmów kowalencyjnego wiązania z enzymem.²⁵

W trakcie pomiarów kinetyki inhibicji proteaz cysteinowych pochodnymi z ugrupowaniem aldehydowym zaobserwowano długi okres osiągania stanu stacjonarnego, co sugerowało, że badane inhibitory należą do grupy wolno wiążących. Jako przyczynę tego zjawiska podaje się jednak nie tyle konieczność zmian konformacyjnych w enzymie, ile małą dostępność inhibitora w roztworze w najbardziej aktywnej postaci, tj. wolnego aldehydu. Szacuje się, że w przypadku leupeptyn zawierających w strukturze wolną grupę guanidynową (schemat 1.2) 42% występuje jako wodzian, 52% jako cykliczny aminol, a tylko 2% stanowi wolny aldehyd.



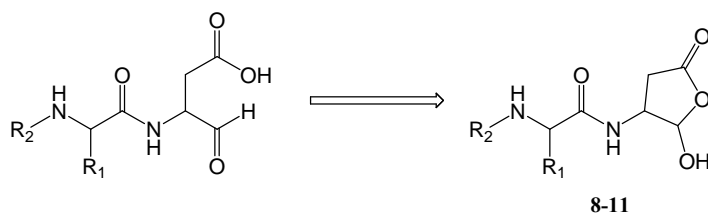
Schemat 1.2:
Mechanizm inhibicji proteaz cysteinowych peptydami z resztą aldehydową na C-końcu na przykładzie *N*-acetylowanego leucylo-leucylo-arginalu

Występująca w przewodzie forma wodzianu jest bardzo słabym elektrofilem, a cykloaminol w ogóle nie reaguje z resztą Cys. Obniża to wypadkową aktywność peptydyloaldehydów. Reaktywność formy karbonylowej jest z kolei przyczyną ograniczenia ich specyficzności. Wymienione właściwości są poważną przeszkodą dla stosowania tych pochodnych *in vivo*.

Aldehydowe pochodne peptydów znalazły zastosowanie przy próbach otrzymania inhibitorów selektywnych wobec kaspaz. Enzymy te należą do klanu CD proteaz cysteinowych. Nazwa kaspazy ang. „caspases” jest akronimem utworzonym z liter i sylab wyrazów wchodzących w skład opisowej nazwy tej rodziny enzymów „cysteinyl aspartate-specific proteases”. Wskazuje ona po pierwsze na przynależność do klasy proteaz cysteinowych, a po drugie na ich specyficzność substratową, dotyczącą w przypadku hydrolaz klanu CD pozycji P1 liganda. Zainteresowanie kaspazami wynika z roli, jaką odgrywają w apoptozie oraz procesach zapalnych.²⁶ Ich aktywność kojarzy się z patogenezą wielu chorób, w tym niedokrwiennego uszkodzenia narządów,¹¹ oraz chorób neurodegeneracyjnych,²⁷ takich jak zanikowe stwardnienie boczne, płasawica Huntingtona, czy choroba Alzheimera.

W badaniach nad rolą proteaz w patogenezie rutynowo wykorzystuje się dostępne komercyjne inhibitory lub sięga się po nowe związki, które projektuje się jako selektywne ligandy wiążące się z wybranym celem. Także precyzyjne określenie funkcji i miejsca działania poszczególnych enzymatycznych czynników stanu zapalnego czy induktorów apoptozy wymaga opracowania ich selektywnych inhibitorów, które ułatwią wniknięcie w mechanizm tych procesów. Jedną z klas związków testowanych w takim celu były aldehydowe pochodne peptydów. Jako wyjściowy wybrano tetrapetyd Ac-Asp-Glu-Val-Asp-H (**5**), którego pierwsze modyfikacje polegały na skróceniu fragmentu rozpoznawanego przez enzym. Usunięcie jednej reszty z *N*-końca cząsteczki (**6**) nie wpłynęło istotnie na aktywność inhibitora (tabela 1.1). Eliminacja kolejnej reszty (**7**) doprowadziła do znacznego obniżenia powinowactwa liganda do enzymu.²⁸

Optymalizacja struktury pochodnych aldehydowych dała podstawy dla opracowania bardziej stabilnych cząsteczek, w których zmodyfikowano grupę funkcyjną reagującą z atomem siarki katalitycznej reszty Cys. Bardzo dobre rezultaty otrzymano przekształcając aldehydowe ugrupowanie podstawnika P1 w wewnątrzcząsteczkowej reakcji tworzenia hemiacetalu z grupą karboksylową jego łańcucha bocznego (schemat 1.3). W ten sposób otrzymano serię dipeptydowych, stabilnych, odwracalnych inhibitorów hydroksylaktamowych o szerokim spektrum działania antykaspazowego **8-11** (tabela 1.1).^{28,29}



Schemat 1.3: Maskowanie ugrupowania aldehydowego w inhibitorach kaspaz

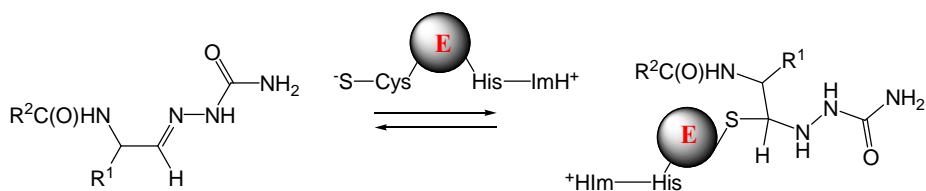
Tabela 1.1: Aktywność odwracalnych inhibitorów z wolnym i zablokowanym ugrupowaniem aldehydowym^{28, 29} o szerokim spektrum działania antykaspazowego

Nr	Wzór inhibitora	<i>IC</i> ₅₀ [μM]				
		Kasp 1	Kasp 2	Kasp 3	Kasp 4	Kasp 5
5	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-H	0,05	0,0035	0,01	0,01	0,08
6	Z-Glu-Leu-Asp-H	0,0065	0,0023	-	0,01	0,03
7	Z-Val-Asp-H	5,85	1,75	10	6,81	11,96
8	1-naftylooksyacetylo-Val-Asp-hac*	0,336	0,355	>10	2,1	1,2
9	N-naftyloaminoacetylo-Val-Asp-hac	0,015	1,55	7,0	6,14	0,450
10	1-naftylooksyacetylo-Leu-Asp-hac	0,570	0,135	0,940	1,81	0,770
11	N-naftyloaminoacetylo-Leu-Asp-hac	0,033	0,013	0,037	1,32	0,0076

hac* - hemiacetalowe pochodne aldehydów

1.4.2 Semikarbazonony

Semikarbazonowe pochodne peptydyloaldehydów hamują aktywność docelowych enzymów słabiej lub znacznie słabiej od swoich prekursorów (tabela 1.2). W mechanizmie inhibicji zakłada się powstawanie tetraedrycznego produktu wskutek ataku tiolanu na iminowy atom węgla semikarbazonu.³⁰ Jest to, podobnie jak w przypadku aldehydów, reakcja odwracalna, co pozwala na użycie semikarbazonów i aldehydów jako ligandów przy oczyszczaniu proteaz cysteinowych i serynowych metodą chromatografii powinowactwa.^{30,31}



R² = reszta peptydowa

Schemat 1.4: Mechanizm inhibicji proteaz cysteinowych pochodnymi z ugrupowaniem semikarbazonowym na przykładzie inhibitorów papainy

Tabela 1.2: Porównanie aktywności inhibitorów z ugrupowaniem aldehydowym i ich semikarbazonowych analogów

Nr	Wzór inhibitora	K _i [nM]		Nr	Wzór inhibitora	K _i [nM]	
		Papaina	Kat B ^{**}			Papaina	Kat B
12	Z-Arg-Ile-Phe-Sk [*]	23	500	16	Z-Arg-Ile-Phe-H	1	500
13	Z-Ile-Phe-Sk	2700	1200	17	Z-Ile-Phe-H	44	1200
14	Z-Phe-Gly-Sk	BD ^{***}	20000	18	Z-Phe-Gly-H	<50	20000
15	Z-Gly-Phe-Gly-Sk	9,2	1000	19	Z-Gly-Phe-Gly-H	5,2	1000

Sk^{*} – semikarbazon, Kat B^{**} - katepsyna B, BD^{***} - brak danych

1.4.3 Trifluorometyloketony

W badaniach *in vivo* nad peptydami z ugrupowaniem aldehydowym zaprojektowanymi jako inhibitory elastazy zaobserwowano gwałtowny spadek ich aktywności wraz z utlenieniem aldehydu do kwasu. Dało to impuls do poszukiwań metabolicznie stabilniejszej grupy funkcyjnej odpowiedzialnej za kowalencyjne wiązanie się inhibitora z enzymem, którą można byłoby zastąpić ugrupowanie aldehydowe łatwo inaktywowane w warunkach fizjologicznych. Zadawalający efekt osiągnięto syntezując trifluorometyloketony (TFMK) jako inhibitory proteaz serynowych.³² Tetraedryczny hemiketal tworzący się podczas wiązania TFMK z centrum aktywnym tych białek cechuje się wysoką trwałością. Jest ona efektem silnego oddziaływania grupy hydroksylowej hemiketalu z resztami budującymi wnękę wiążącą oksyanion.³³ Wysokie powinowactwo do tych reszt jest wynikiem podwyższonej kwasowości grupy OH. Wpływa na to bliskie sąsiedztwo atomów fluoru. Inhibitory z tej grupy okazały się aktywne wobec różnych enzymów, w tym

metaloproteaz (karboksypeptydaza A, enzym konwertujący angiotensynę) i proteaz aspartylowych (pepsyna, renina) oraz esteraz (acetylocholinesteraza). W przypadku metaloproteaz i proteaz aspartylowych inhibicja przebiega z udziałem hydratowanej formy liganda i bez tworzenia wiązania kowalencyjnego.

Zbliżony mechanizm katalityczny proteaz serynowych i cysteinowych powoduje, że mogą one być inaktywowane przez te same ligandy. W przypadku trifluorometyloketonów i metyloketonów, które okazały się skuteczne względem enzymów serynowych, zaobserwowano ich niższą aktywność wobec rutynowo testowanych proteaz tiolowych. W porównaniu do analogów aldehydowych jest ona mniejsza o kilka rzędów wielkości (tabela 1.3).

Tabela 1.3: Porównanie reaktywności analogów aldehydowych i metyloketonów względem papainy i katepsyny B

Wzór inhibitora	K_i [μM]		Wzór inhibitora	K_i [μM]	
	Papaina	Kat B		Papaina	Kat B
Z-Phe-Ala-CH ₃		31	Z-Phe-Ala-H		0,021
Ac-Phe-Gly-CH ₃	1550		Ac-Phe-Gly-H	0,046	

Także w tym przypadku inhibicja ma charakter odwracalny ze względu na tworzący się przejściowy hemitioketal. Słabszy efekt inhibitorowy tłumaczy się natomiast mniejszą stabilnością termodynamiczną hemitioketali w porównaniu do hemiketali, pochodnych fluoroketonów.³⁴

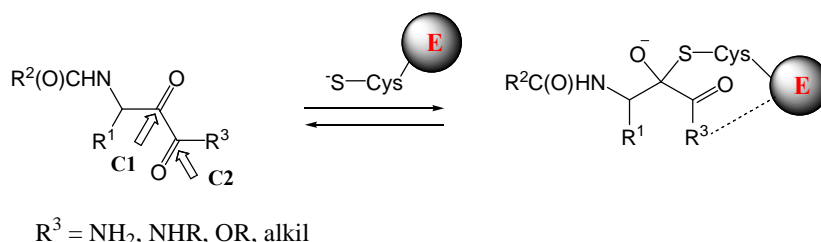
1.4.4 α -Ketokwasy, α -ketoestry, α -ketoamidy i diketony

Dane literaturowe przedstawione w poprzednim podrozdziale wskazują na niską aktywność ugrupowania TFMK względem proteaz cysteinowych. W poszukiwaniach alternatywnej grupy elektronoakceptorowej odwołano się do wyników otrzymanych dla proteaz serynowych i C-koniec łańcucha peptydowego inhibitorów modyfikowano różnymi pochodnymi ugrupowania ketokarboksylowego. Aktywność tych pochodnych obserwowana względem proteaz serynowych rośnie w szeregu aldehydy < TFMK < α -diketony < ketoestry,³⁵ podczas gdy dla proteaz cysteinowych szereg ten układa się następująco: TFMK < metyloketony < pochodne α -ketokwasów = α -diketony <

aldehdy.^{36,37} Jednak wartości K_i otrzymywane dla tych inhibitorów bardzo różnią się w zależności od docelowego enzymu. Wyniki mieszczą się tutaj w zakresie od kilkudziesięciu nM do ponad 100 μ M. Ważnym czynnikiem wpływającym na aktywność tych związków jest stabilizacja produktu przejściowego w centrum aktywnym poprzez tworzenie mostków solnych, wiązania wodorowego z resztą His we wnęce wiążącej oksyanion, czy w przypadku kalpain – oddziaływanie z jodem Ca^{2+} .

Przyłączenie nukleofila do atomu C1 grupy karbonylowej podstawnika P1, podobnie jak redukcja tego ugrupowania, prowadzi do całkowitego zaniku aktywności inhibitora. Fakt ten sugeruje, że elementem mechanizmu inhibicji musi być atak tiolu na atom węgla C1 (schemat 1.5).³⁵⁻³⁷

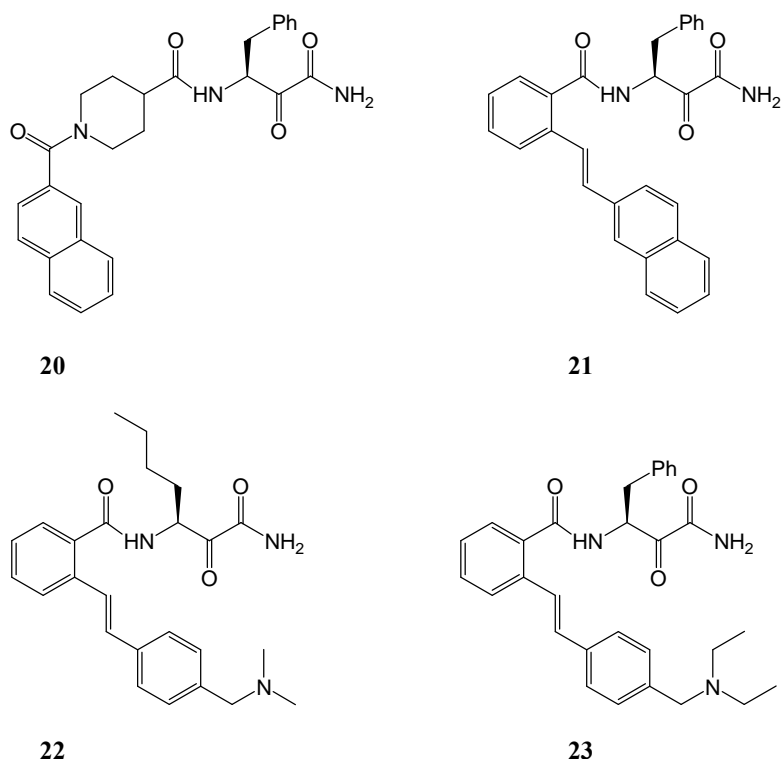
Kluczowym zagadnieniem jest możliwość użycia opisywanych pochodnych *in vivo*. Z jednej strony konieczne są ich modyfikacje poprawiające rozpuszczalność w wodzie, które jednocześnie nie zmniejszałyby aktywności.³⁸ Z drugiej strony, pochodne do stosowania w warunkach fizjologicznych, skierowane na cele wewnątrzkomórkowe, powinny przekraczać barierę błon biologicznych, co ogranicza możliwość użycia wolnych ketokwasów.³⁶



Schemat 1.5. Mechanizm inhibicji proteaz cysteinowych pochodnymi kwasów ketokarboksylowych.

Zainteresowanie omawianymi w tym podrozdziale klasami związków, a szczególnie ketoamidami, jako inhibitorami o potencjalnych zastosowaniach medycznych systematycznie wzrasta na skutek aktualnych doniesień o ich aktywności względem tak ważnych enzymów, jak kalpajny. Skierowanie uwagi na inhibicję tych proteaz wynika z potrzeby zrozumienia ich nie w pełni rozpoznanych funkcji fizjologicznych, których zaburzenie zgodnie z aktualnym stanem wiedzy kojarzy się z inicjowaniem i przebiegiem różnych procesów degeneracyjnych. Podwyższoną aktywność tych enzymów stwierdza się w zmienionych chorobowo tkankach w przypadku niedokrwienych uszkodzeń serca, mózgu, w urazach rdzenia kręgowego, przy zawale

mięśnia sercowego. Przypisuje im się także pewną, nie do końca poznaną rolę w chorobach Alzheimer, Huntingtona i Parkinsona, dystrofii mięśniowej i nowotworach przewodu pokarmowego.^{39,40,41} Struktury związków, które pomyślnie przeszły testy *in vitro*, posiadający obiecujący profil farmakokinetyczny zaprezentowano na rysunku 1.2. Związek **20** przebadano jako potencjalny środek osłonowy przy urazie mózgu.



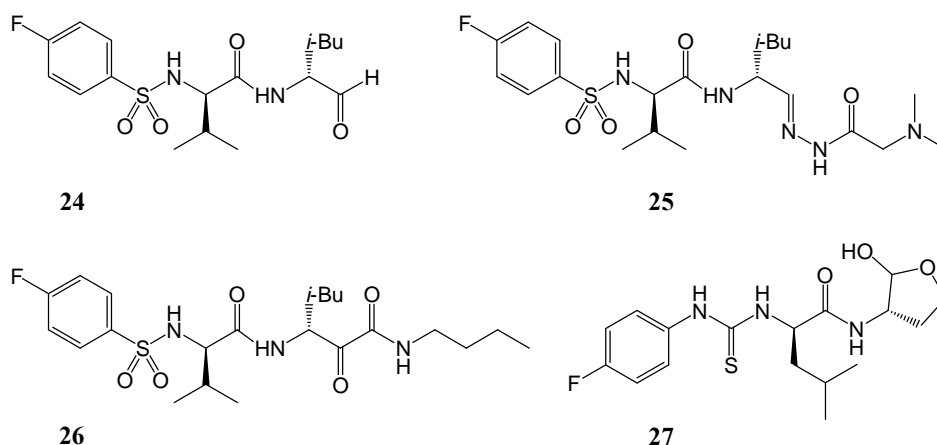
Rysunek 1.2. Ketoamidowe inhibitory kalpains-1.

Podanie tego inhibitora redukuje liczbę komórek nerwowych uszkodzonych wskutek stymulowanego urazu u użytych w eksperymencie szczurów o 41% w relacji do poziomu uszkodzeń neuronów u zwierząt kontrolnych. Związek **23** jest analogiem niedawno poznanego inhibitora BSF 409425, którego struktury nie opublikowano.⁴² Podanie BSF 409425 po stymulowanym niedokrwiennym, indukowanym reperfuzyją uszkodzeniu mitochondriów serc króliczych znacznie zmniejsza negatywne skutki reperfuzji.

Związek **24** i jego pochodne⁴³ (w tym ketoamidowe) są dobrym przykładem demonstrującym sposoby modyfikowania struktury wiodącej celem poprawienia parametrów farmakokinetycznych modyfikowanego związku przy zachowanej

aktywności. Jest on aktywny tylko wobec kalpain μ i m oraz katepsyn B i L. Wartości IC_{50} osiągane z jego udziałem mieszczą się w zakresie od kilku do kilkudziesięciu nM. Wobec innych proteaz cysteinowych, a także trombiny jego aktywność jest marginalna ($IC_{50} > 100 \mu M$). Cechuje go także brak toksyczności w wykonanych standardowych próbach na szczurach. Nie indukuje ani nie hamuje aktywności cytochromu P450. W badaniach *in vivo* zapobiegał powstawaniu zaćmy,⁴⁴ działał ochronnie w przypadku indukowanych reperfuzją uszkodzeń w niedokrwionej siatkówce oka,⁴⁵ wykazywał korzystny wpływ na odzyskiwanie sprawności po rozległych urazach głowy.⁴⁶

O konieczności modyfikacji związku **24** zadecydowały jego niska rozpuszczalność, ograniczona zdolność przenikania przez błony komórkowe oraz współczynnik wiązania przez składniki surowicy powyżej 85 %.

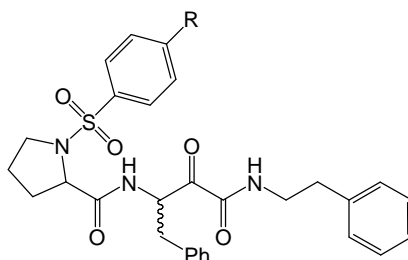


Rysunek 1.3: Inhibitory otrzymane poprzez modyfikacje struktury **24**

Dwukrotny wzrost rozpuszczalności w wodzie osiągnięto zamieniając ugrupowanie aldehydowe na resztę hydrazonu (**25**), jednakże z dziesięciokrotnym spadkiem aktywności.⁴⁷ Odpowiedni analog ketoamidowy (**26**) wykazywał aktywność na poziomie pochodnej **24**, ale nie zaobserwowano w tym przypadku poprawy rozpuszczalności.⁴⁸ Najlepszy efekt uzyskano modyfikując *N*- i *C*-końiec cząsteczek. Na reaktywne ugrupowanie elektrofilowe wybrano cykliczny hemiacetal. *N*-końcowy fragment inhibitora **27** stanowi pierścień *p*-fluorobenzenowy połączony z resztą cząsteczki fragmentem tiomocznikowym. W rezultacie poprawił się parametr przenikalności przez błony komórkowe (33 razy w stosunku do wyjściowego inhibitora

24), a jego skuteczność w zapobieganiu zaćmie oceniona na podstawie wyników testu przeprowadzonego na kulturze soczewek oczu szczurzych jest wysoka.⁴⁸

Wiele spośród białek komórkowych będących substratami kalpain jest zaangażowanych w procesy, których zaburzenie prowadzi do powstawania zmian nowotworowych. Wymienia się tu czynniki transkrypcji c-Fos i c-Jun,⁴⁹ białko supresorowe p53,^{50,51} antyapoptotyczne białko bcl-1 i proapoptotyczne białko Bax.⁵²⁻⁵⁴ Czynniki te są zaangażowane w patogenezę różnych nowotworów, co wskazuje na istotne funkcje regulacyjne kalpain. Ponadto stwierdzono udział tych enzymów w regulacji proliferacji i śmierci komórek różnych typów. Wiele doniesień wskazuje na kooperację kalpain i kaspaz w indukcji apoptozy.⁵⁰ Zaangażowanie kalpain w podstawowe procesy fizjologii komórki oraz potwierdzona rola tych enzymów w kancerogenezie pozwala uznać je za atrakcyjny cel przy opracowywaniu terapii nowotworów.⁵⁵ Wśród nowo otrzymanych inhibitorów kalpain, które zaprojektowano jako potencjalne cytotoksyczne leki przeciwnowotworowe znalazły się α -ketoamidowe pochodne peptydów **28-30**.⁵⁶



- 28**, R = CH₃
29, R = NO₂
30, R = OCH₃

Rysunek 1.4: Ketoamidowe inhibitory kalpain jako potencjalne cytotoksyczne substancje przeciwnowotworowe

Struktury inhibitorów **28-30** zostały zaplanowane na bazie wcześniejszych doniesień o preferencjach substratowych kalpain, z których wynikało, że peptydyloaldehydy zawierające D lub L prolinę w pozycji P2 są silnie wiązane przez te hydrolazy.⁵⁷ Zsyntezowano i przebadano szereg pochodnych, w których modyfikowano pierścień proliny przyłączając różne reszty do atomu N_α. Ketoamidy w odróżnieniu od swoich podatnych na utlenianie i hydratację aldehydowych analogów wykazują znacznie większą stabilność w warunkach fizjologicznych.^{58,59} Z tego względu są bardziej obiecującą klasą związków, które wykorzystuje się jako „narzędzia” przy opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych. Wiadomo, że niektóre inhibitory

kalpain wykazują aktywność wobec katepsyny B. Niewystarczająca selektywność tych związków utrudnia precyzyjne określenie fizjologicznej roli kalpain. Przykładem inhibitorów nadających się do tego celu są pochodne **28-30**. Okazały się one selektywnymi i skutecznymi inaktywatorami kalpainsy μ (tabela 1.4), chociaż były około dziesięciokrotnie mniej aktywne od swoich aldehydowych analogów. W badaniach cytotoksyczności odpowiadające sobie analogi aldehydowe i ketoamidowe wykazały podobną skuteczność zahamowania wzrostu w badanych liniach komórkowych, pomimo większej aktywności aldehydów *in vitro*. Obserwacje te tłumaczy się większą stabilnością ketoamidów *in vivo*,⁵⁸⁻⁶⁰ a także ich wyższą lipofilowością ułatwiającą penetrację cząsteczek do komórek.

Tabela 1.4: Porównanie aktywności inhibitorów ketoamidowych zawierających w pozycji P2 modyfikowaną resztę proliny względem kalpainsy μ i katepsyny B

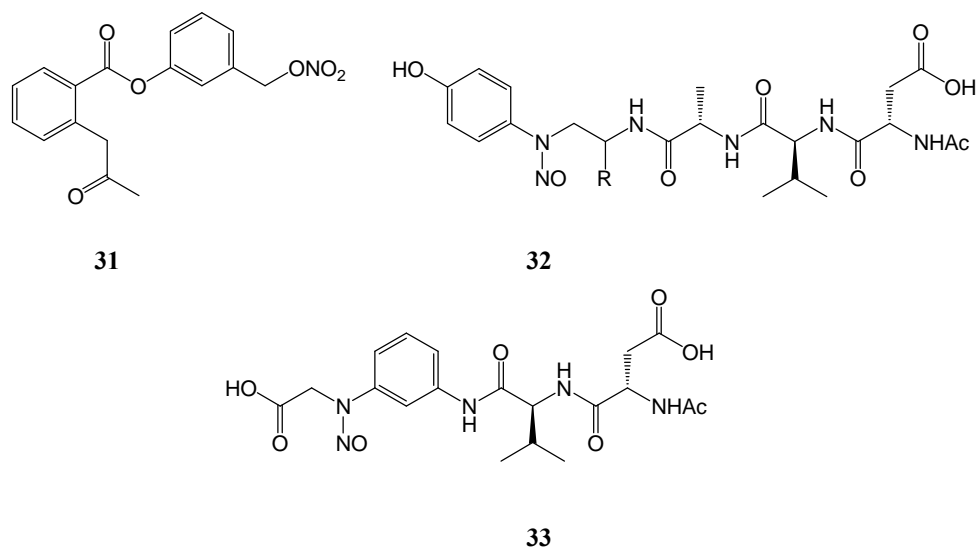
Nr	Kalp μ *	Kat B**
	K_i [μ M]	K_i [μ M]
28	0,850 \pm 0,039	6,90 \pm 0,17
29	0,280 \pm 0,021	5,18 \pm 0,13
30	0,450 \pm 0,081	2,59 \pm 0,11

Kalp μ * - kalpainsa μ Kat B** - katepsyna B

1.4.5 Inhibitory S-nitrozujące

Jednym z mechanizmów regulacji aktywności proteaz cysteinowych *in vivo* jest nitrozowanie występujących w nich reszt tiolowych. Zakładając możliwość skutecznego naśladowania tego naturalnego sposobu regulacji podjęto próby otrzymania inaktywatorów, hamowałyby enzym poprzez S-nitrozowanie. Związek **31** (rysunek 1.5), pochodna aspiryny, jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym uwalniającym tlenek azotu. Przechodzi on obecnie drugą fazę badań klinicznych jako potencjalny lek do stosowania w chorobach sercowo-naczyniowych, w tym chorobie okluzyjnej tętnic obwodowych.¹¹ Stwierdzono, że w odróżnieniu od aspiryny, hamuje on aktywność kaspazy 1 z EC₅₀ na poziomie 10 μ M,^{61,62} prawdopodobnie poprzez nitrozowanie katalitycznej reszty Cys.^{61,63} Ponadto, pochodna **31** nie wykazuje toksyczności żołądkowo-jelitowej. Wydaje się, że inhibitory działające poprzez S-nitrozowanie stwarzają duże nadzieje jako farmaceutyki w terapii przewlekłych zapaleń i chorób

autoimmunologicznych.⁶² Liczne badania prowadzone z wykorzystaniem zwierzęcych modeli schorzeń człowieka potwierdzają możliwość potencjalnego zastosowania inhibitorów kaspaz uczestniczących w apoptozie jako leków. Do związków uwalniających tlenek azotu, które okazały się inhibitorami kaspaz należą także peptydowe pochodne zawierające w strukturze zmodyfikowaną resztę *N*-nitrozoaniliny (**32**, **33**).

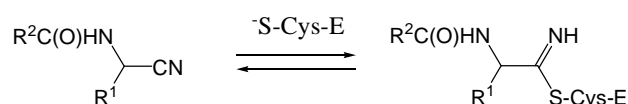


Rysunek 1.5: Nitrozujące inhibitory kaspaz. Pochodna aspiryny NCX-4016, inhibitor kaspazy 1 (**31**), pochodne *N*-nitrozoanilinowe **32**, **33**, inhibitory kaspazy 3.

W oparciu o ich strukturę mogą być projektowane nowe związki nitrozujące reszty docelowych enzymów.⁶³ Omawiając inhibicję czynnikami uwalniającymi tlenek azotu nie można zapominać, że cząsteczka NO może wpływać na różne składniki komórki. Fakt, że niektóre kaspazy w środowisku inhibitorów nitrozujących nie odzyskują aktywności po wprowadzeniu do środowiska reakcji silnego reduktora (np. ditiotretolu) pozwala zakładać, że inaktywacja enzymów poprzez przyłączenie grupy nitrozowej do katalitycznej reszty cysteiny nie jest jedynym mechanizmem z udziałem donorów NO zapobiegającym apoptozie. Prawdopodobnie bezpośrednie działanie NO lub jego metabolitów na poziomie apoptosomu przyczynia się do zablokowania sekwencyjnej aktywacji kaspaz 9, 3 i 8.^{64,65}

1.4.6 Nitryle

Peptydy zawierające grupę cyjanową dość wcześnie zostały zidentyfikowane jako odwracalne inhibitory papainy⁶⁶ ze stałymi K_i na poziomie od kilku do kilkudziesięciu μM . Zgodnie ze zweryfikowanym technikami NMR modelem inhibicji, na skutek ataku katalitycznej reszty cysteiny na atom węgla grupy nitylowej powstaje produkt typu „dead-end”.⁶⁷ Tworzący się w ten sposób izotioamid nie ulega hydrolizie (schemat 1.6).



Schemat 1.6: Mechanizm inhibicji proteaz cysteinowych pochodnymi z ugrupowaniem nitylowym; E = enzym

Peptydynitryle w ostatnich latach budzą coraz większe zainteresowanie jako odwracalne inhibitory proteaz cysteinowych.^{68,69} Wykazują one tylko nieznaczną aktywność względem enzymów serynowych. Podstawy selektywności można wyjaśnić w oparciu o regułę **HSAB** (Hard Soft Acid Base).⁷¹ Zgodnie z nią, addycja miękkiego, polaryzowalnego nukleofila siarkowego do miękkiego elektrofila, jakim jest atom węgla ugrupowania cyjanowego, jest uprzywilejowana względem reakcji z podstawnikiem hydroksylowym reszty seryny - twardym nukleofilem. Z enzymologicznego punktu widzenia, selektywność wynika z różnic w stabilności tetraedrycznego stanu przejściowego w reakcji hydrolizy wiązania peptydowego przez oba typy proteaz. Reakcje katalizowane przez enzymy cysteinowe przechodzą przez mniej naprężony stan przejściowy w porównaniu do hydrolizy z udziałem proteaz serynowych. Z tego względu jego stabilizacja przez wnękę wiążącą oksyanion nie jest aż tak istotna.^{72,73} Dlatego, w odróżnieniu od proteaz serynowych, proteazy tiolowe w reakcji z nitylowym ligandem mogą tworzyć płaski tioimid o niższej energii w porównaniu do tetraedrycznego stanu przejściowego powstającego w reakcji enzymu z substratem. Daje to przewagę nitylowym ligandom konkurującym z substratem o miejsce aktywne.

Inhibitory proteaz z reaktywnym ugrupowaniem elektrofilowym CN znalazły się obok peptydyloaldehydów, winylosulfonów, *O*-acylowanych kwasów hydroksamowych, halometyloketonów, diazoketonów i epoksydów wśród związków skutecznych względem hydrolaz klanu CA. W tej grupie wyróżnia je oraz

peptydyloaldehydy odwracalny charakter uzyskiwanej z ich udziałem inhibicji. Pewną przewagę nad aldehydami daje im niższa reaktywność, w tym mniejsza wrażliwość na warunki utleniające, co zapewnia im wyższą stabilność i selektywność *in vivo*.

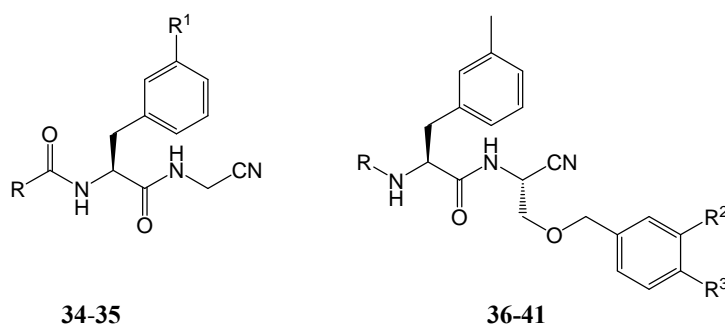
Do klanu CA proteaz cysteinowych zaliczają się enzymy wykazujące podobieństwo do papainy. Znalazły się tutaj między innymi proteazy pasożytów człowieka, a także enzymy ssaków. Większość z nich stanowi atrakcyjne cele terapeutyczne ze względu na ich kluczową rolę w patofizjologii chorób pasożytniczych i ogólnoustrojowych.⁷⁴ Jedenaście opisanych enzymów z grupy papainy wyizolowano z tkanek człowieka. Są to katepsyny B, C, H, F, K, L, O, S, V, W oraz X. Wykazują one wysoki stopień homologii. Występują przede wszystkim w lizosomach, ale są także wydzielane jako nieaktywne prekursory przez różne komórki, w tym makrofagi, fibroblasty, osteoklasty oraz komórki uszkodzone. Za rozpoznanie liganda przez te enzymy odpowiadają głównie oddziaływania z wnękami S2, S1 i S1'.

Obok zaangażowania katepsyn w gospodarkę białkową komórki pełnią one również znacznie bardziej wyspecjalizowane funkcje fizjologiczne.^{75,76} Z tego powodu ich aktywność w komórce jest bardzo ściśle regulowana zarówno poprzez kontrolowaną proteolizę, jak i hamowanie przez specyficzne endogenne inhibitory.⁷⁷ Zaburzenie wewnętrznej kontroli ich aktywności może prowadzić do rozwoju różnych chorób w tym nowotworów,^{78,79} chorób autoimmunologicznych (*miastenia gravis*),⁸⁰ osteoporozy.⁸¹

Z uwagi na udział katepsyn w patogenezie wielu schorzeń ciągle poszukuje się selektywnych inhibitorów dla tych enzymów. Peptydylonitryle są ostatnio intensywnie badane jako jedna z bardziej obiecujących klas związków skutecznych wobec proteaz klanu CA. Niedawno opisano dipeptydy z ugrupowaniem CN, zaprojektowane jako specyficzne inhibitory katepsyny B.⁸² We wstępnej fazie badań metodami modelowania molekularnego optymalizowano podstawniki P1 i P2 struktury wiodącej **34** ($IC_{50} = 62 \mu\text{M}$), opierając się na danych o strukturze kompleksu enzym-inhibitor, uzyskanymi przy pomocy krystalografii rentgenowskiej. Otrzymano tym sposobem związki o satysfakcjonującej aktywności inhibitorowej z IC_{50} od kilku do kilkudziesięciu nM (tabela 1.5). Metodami krystalograficznymi potwierdzono powstawanie izotioamidu w wyniku reakcji reszty tiolowej enzymu i grupy nitrylowej inhibitora, jako elementu mechanizmu inhibicji. Na przykładzie opisywanej grupy związków można prześledzić wstępne fazy procesu powstawania potencjalnego leku, w których pierwotną strukturę wiodącą modyfikuje się celem podniesienia selektywności inhibitora i poprawienia jego

parametrów farmakokinetycznych. Lepszą selektywność uzyskano rozbudowując cząsteczki ligandów o dodatkowe reszty P1' i P3. Okazało się, że estryfikacja grupy karboksylowej podstawnika P1' powodowała, że ligand wiązał się tylko z katepsyną B, a nie wpływał na aktywność katepsyn L i S. Sugerowało to istotny udział wolnej grupy karboksylowej P1' w wiązaniu inhibitorów.

Tabela 1.5: Aktywność wybranych nitrylowych inhibitorów katepsyn



Nr	R	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ nM			Surowica Stężenie [μM]
					Kat B*	Kat L*	Kat S*	
34	PhCH ₂ O	H			62000			
35	Ph ₂ CH	Me			45	6	88	
36	Ph ₂ CHCO		3-CO ₂ Me	H	47			
37	Ph ₂ CHCO		3-COOH	H	1,8	20	46	
38	2,4-di-F-PhCO		3-COOH	H	6,8	554	937	0,09
39	Ph		3-COOH	H	49	1800	2000	1,1
40	Ph		3-COOH,	Cl	8,7	1400	1700	1,88
41	Ph		3-COOH,	F	12,2	1400	1600	5,27

* Kat B - katepsyna B, Kat L - katepsyna L, Kat S - katepsyna S

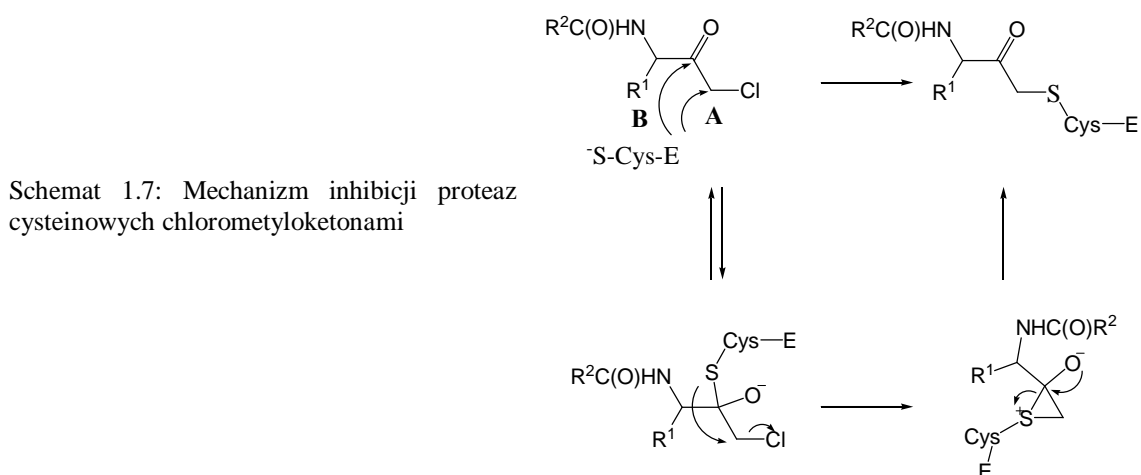
Związek **38** (tabela 1.5) jest dobrym przykładem demonstrującym, że nie zawsze powodzenie testów aktywności i selektywności *in vitro* przekłada się na pozytywne rezultaty badań farmakokinetycznych realizowanych w warunkach fizjologicznych.

Związek **38** okazał się zdecydowanie preferowanym ligandem katepsyny B ($IC_{50} = 6,8$ nM), a znacznie słabszym inhibitorem katepsyny L ($IC_{50} = 554$ nM) i S ($IC_{50} = 937$ nM). Przy tak korzystnej selektywności jest jednak zbyt labilny *in vivo*. Po upływie 4 godzin od podania szczurom drogą pokarmową występował w ich surowicy w niskim stężeniu 0,09 μM. Dopiero zmodyfikowany związek **41** pomyślnie przeszedł testy *in*

vivo wykazując zadowalającą trwałość (stężenie w surowicy po podaniu doustnym utrzymywało się na poziomie mikromolarnym przez ponad 7 godzin) oraz biodostępność ($F = 128 \pm 59\%$), chociaż dwa inne parametry: klirens i okres półtrwania miały wartości mniej zadowalające.

1.4.7 Halometyloketony

Pierwszym powszechnie stosowanym reagentem znakującym na skutek powinowactwa do enzymu katalityczną resztę His w chymotrypsynie był TPCK (1-(tosyloamino)-2-fenyletylochlorometyloketon).⁸³ Proteazy cysteinowe również ulegają tego typu inhibicji pod wpływem TPCK, przy czym, jak wykazano metodami krystalografii rentgenowskiej, TPCK wiąże się kowalencyjnie z resztą cysteiny a nie histydyny w miejscu aktywnym.⁸⁴ Alkilowanie reszty cysteiny może przebiegać na dwa sposoby (schemat 1.7).³⁰



Schemat 1.7: Mechanizm inhibicji proteaz cysteinowych chlorometyloketonami

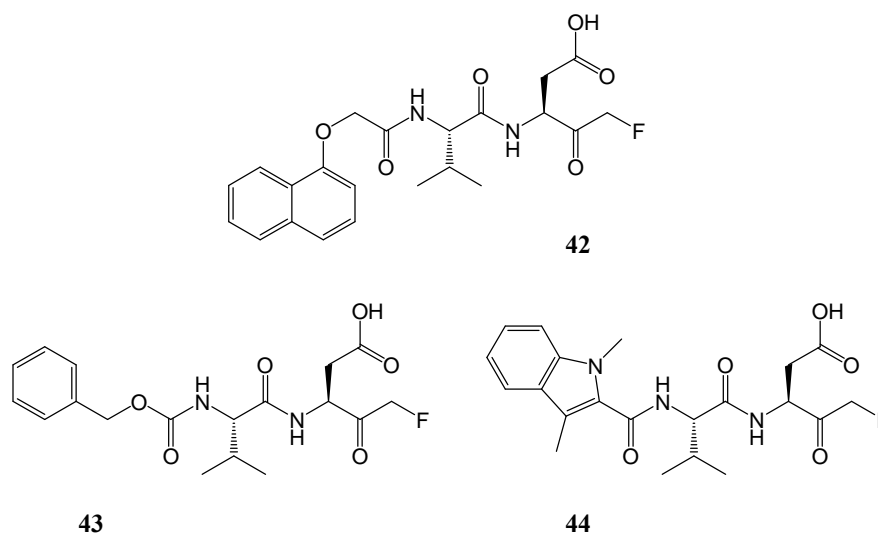
Pierwszy to substytucja nukleofilowa przebiegająca poprzez bezpośredni atak tiolanu na elektrofilowy atom węgla ugrupowania chlorometylowego (wariant A, schemat 1.7). Możliwy jest także mechanizm trój etapowy. W pierwszym etapie mamy do czynienia z nukleofilową addycją atomu siarki katalitycznej reszty Cys do ugrupowania karbonylowego liganda i utworzeniem tetraedrycznego produktu pośredniego. Następnie tworzy się jon sulfoniowy wskutek ataku pary elektronowej atomu siarki na elektrofilowy atom węgla ugrupowania chlorometylowego. W ostatniej fazie naprężony trójczłonowy pierścień jonu sulfoniowego ulega rozerwaniu z odtworzeniem ugrupowania karbonylowego, dając w efekcie taki sam produkt, jaki powstaje na drodze

A. Ponieważ formowanie się tetraedrycznego stanu przejściowego jest elementem normalnie przebiegającego procesu katalitycznego, inhibicja zgodnie z mechanizmem **B** kwalifikowałaby chlorometyloketony bardziej do grupy inhibitorów działających w oparciu o mechanizm katalityczny niż do reagentów znakujących.

Podobnie jak w przypadku inhibitorów z ugrupowaniem aldehydowym pewną selektywność działania reaktywnych chlorometyloketonów można osiągnąć wprowadzając odpowiednie reszty w pozycje P1 i P2. Właśnie ryzyko niespecyficzných reakcji jest podstawowym problemem pojawiającym się przy próbie użycia chlorometyloketonów w warunkach *in vivo*. Bowiem mogą one wpływać nie tylko na aktywność proteaz serynowych i cysteinowych, ale także reagować z innymi ważnymi dla metabolizmu produktami przemian biochemicznych i enzymami, które posiadają ugrupowanie SH (glutation, enzymy inne niż proteazy). Selektywność trudna do osiągnięcia w przypadku inhibitorów tak reaktywnych jak chlorometyloketony jest poważnym ograniczeniem dla ich wykorzystania jako struktur wiodących przy opracowywaniu nowych leków, przede wszystkim ze względu na ich potencjalnie wysoką toksyczność. Problem ten udało się częściowo rozwiązać zastępując atom chloru w grupie chlorometylowej gorszą grupą odchodzącą – atomem fluoru, co obniżyło ryzyko niespecyficznego alkilowania grup SH. Zabieg ten dla wszystkich przebadanych fluorometyloketonów przyczynił się do spadku aktywności w reakcji z glutationem do poziomu 0,2 % względem aktywności mierzonej dla odpowiadających im chlorometyloketonów.⁶⁰ Tak zmodyfikowane cząsteczki pozostawały wciąż wystarczająco aktywne względem proteaz cysteinowych, natomiast proteazy serynowe hamowały już znacznie słabiej.

Omawiając halometyloketony warto przytoczyć rezultaty otrzymane przy optymalizacji inhibitorów kaspaz, opartych na strukturze wiodącej 1-naftyloksyacetylo-Val-Asp-elktrofil.⁸⁵ Wśród struktur wyjściowych znalazły acyloksymetyloketony oraz fluorometyloketony.⁸⁶⁻⁸⁹ W badaniach kinetyki inhibicji kaspaz pochodzącym z tej serii związków fluorometyloketonem **42** (rysunek 1.6) otrzymano bardzo dobre rezultaty: $k_i/K_i = 129000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dla kaspazy 1, $207000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dla kaspazy 3, $36842 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dla kaspazy 6 i $71667 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dla kaspazy 8. Stosując tą pochodną jako induktor śmierci i stanu zapalnego w kilku typach modeli komórkowych określono wartości stężenia połowicznego zahamowania aktywności kaspaz zaangażowanych w te procesy. Dla komórek Con A $IC_{50} = 3,05 \text{ }\mu\text{M}$, monocytów $0,95 \text{ }\mu\text{M}$, a dla komórek Jurkat wartość IC_{50} wyniosła $0,24 \text{ }\mu\text{M}$. Zawierający tą samą sekwencję aminokwasów

fluorometyloketon **44** scharakteryzowano jako skuteczny nieodwracalny inhibitor o szerokim spektrum aktywności wobec kaspaz. Okazał się on efektywny jako środek zapobiegający uszkodzeniom wątroby będącym skutkiem procesów, w których pośredniczą przeciwciała anti-Fas, niezależnie od drogi podania (*per os* lub dożylnie).⁹⁰



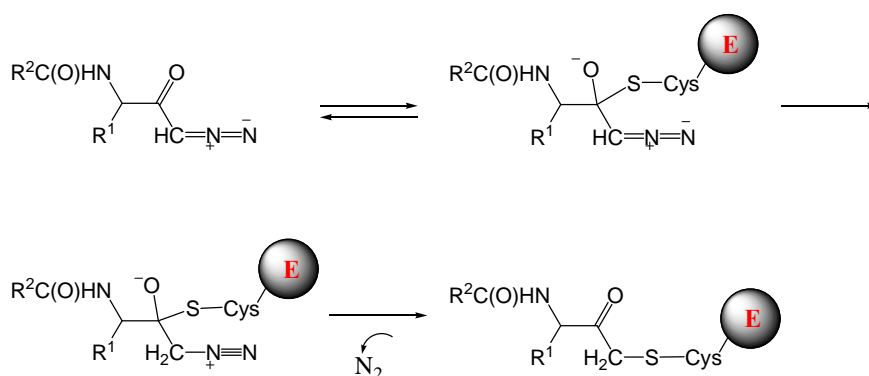
Rysunek 1.6: Fluorometyloketony zaprojektowane na podstawie struktury wiodącej 1-naftyloksyacetylo-Val-Asp-elktrofil jako inhibitory o szerokim spektrum aktywności antykaspazowej.

Również związek **43** o mniej zaawansowanej strukturze - Cbz-Val-Asp-CH₂F – skutecznie hamował działanie kaspaz 1, 3, 6, 7, 8 i 9 z *IC*₅₀ w zakresie od 5 do 20 nM, nie wpływając istotnie na aktywność katepsyny B, kalpajny I czy czynnika Xa. Użyty w badaniach opartych na komórkowych modelach procesów apoptotycznych, np. procesingu kaspazy-3, czy fragmentacji DNA wykazywał wyższą aktywność w porównaniu do analogów tri i tetrapeptydowych. Zablokowanie apoptozy następowało już przy 0,5 μM stężeniu inhibitora. Nieodwracalny inhibitor kaspaz **43** ujawnia interesujący profil właściwości zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Okazał się skuteczną substancją ochronną zapobiegającą uszkodzeniom komórkowym w trzech zwierzęcych modelach apoptozy: towarzyszącej uszkodzeniom wątroby, występującej przy ostrym zawale mięśnia sercowego oraz prowadzącej do śmierci komórek w indukowanym reperfuzją niedokrwiennym uszkodzeniu mózgu.⁹¹ Niestety, także w przypadku opisanych wyżej pochodnych o potwierdzonej skuteczności w blokowaniu apoptozy w modelach komórkowych i zwierzęcych istnieje poważny problem toksyczności powstającego w wyniku ich metabolicznego rozpadu fluorooctanu.

Związek ten włączany jest do cyklu kwasów trójkarboksylowych w komórce zaburzając wytwarzanie ATP.⁹²

1.4.8 Ketony diazometylowe

Do postępu w badaniach nad diazometyloketonami przyczyniło się odkrycie, że antybiotyk azaseryna hamuje wzrost komórkowy na skutek alkiłowania grupy tiolowej w amidotransferazie, enzymie zaangażowanym w syntezę puryn.³⁷ Badano również diazometyloketony syntetyczne, które były produktami przejściowymi w syntezie chlorometyloketonów. Nie wykazywały one żadnej aktywności względem proteaz serynowych.⁹³ Stwarzało to szanse na otrzymanie inhibitorów działających selektywnie względem proteaz cysteinowych. Dodatkowym atutem tej klasy związków jest brak reaktywności wobec prostych tioli, takich jak merkaptoetanol czy ditiotreitól. Wiele spośród syntetycznych diazometyloketonów okazało się skutecznymi i specyficznymi inhibitorami enzymów z grupy proteaz cysteinowych.^{37,93} Jeden z proponowanych mechanizmów inhibicji zakłada, że w pierwszym etapie następuje atak tiolanu na karbonylowy atom węgla i utworzenie tetraedrycznego hemitioketalu. Następnie atom węgla ugrupowania diazometinowego jest protonowany przez atom wodoru z pierścienia imidazolowego reszty histydyny w etapie określającym szybkość reakcji. W końcu, poprzez trójczłonowy stan przejściowy formowany jest tioeterowy produkt końcowy z odejściem cząsteczki azotu (schemat 1.8).³⁰ Zgodnie z nomenklaturą podaną wyżej jest to przykład inhibicji samobójczej.⁹⁴



Schemat 1.8. Mechanizm inhibicji proteaz cysteinowych diazometyloketonami

Z punktu widzenia przeznaczenia potencjalnych inhibitorów warto przyjrzeć się zależności ich aktywności od pH środowiska reakcji. Chlorometyloketony w podstawieniu nukleofilowym zdecydowanie lepiej reagują ze zdeprotonowaną grupą SH, a więc w pH powyżej 7. Natomiast diazometyloketony, ze względu na etap protonowania, niezbędny do utworzenia niestabilnego kationu diazoniowego, działają optymalnie w środowisku lekko kwaśnym.³⁰ Zaburzenie systemu rezonansowego w ugrupowaniu diazometinowym na skutek tworzenia tetraedrycznego hemitioketalu dodatkowo ułatwia protonowanie.

Brak reaktywności związków z omawianej grupy względem prostych tioli i selektywność względem jednej grupy proteaz uczynił je cennym narzędziem w badaniach prowadzonych z udziałem proteaz cysteinowych w kulturach komórkowych.^{9,30} Eksperymenty ze znakowanymi radioaktywnie diazometyloketonami przeprowadzone na różnych tkankach ludzkich potwierdziły, że nie wiążą się one z innymi celami oprócz proteaz tiolowych.⁹⁵ Mimo to, wielu badaczy wyklucza stosowanie diazometyloketonów jako leków z uwagi na ich labilność i reaktywność, które mogą decydować o ich ewentualnej toksyczności.⁹ Niemniej, udokumentowano przypadki, które pokazują, że nie musi to być regułą. Pochodna Z-Leu-Val-Gly-CHN₂ hamuje wzrost wielu paciorkowców *in vitro* oraz *in vivo*. Nawet dziesięciokrotnie przekroczona dawka terapeutyczna w leczeniu śmiertelnej infekcji wywołanej przez paciorkowce u myszy nie wywołuje efektu toksycznego.⁹⁶ Te optymistyczne doniesienia zostały zweryfikowane na podstawie aktualnych wyników badań toksykologicznych. Stwierdzono, że peptydowe pochodne z ugrupowaniem diazometinowym są toksyczne dla rozwijającego się organizmu podczas embriogenezy.⁹⁷

1.4.9 Ketony acyloksymetylowe

Związki z ugrupowaniem acyloksymetylowym pod względem działania przypominają opisane już monofluorometyloketony. W tym przypadku objętościowa grupa -OC(O)R, mało reaktywna w warunkach reakcji S_N2, decyduje o obniżonej reaktywności potencjalnych ligandów.⁹⁸ Budowa tych związków stwarza duże możliwości modelowania specyficzności, zarówno na poziomie sekwencji reszt P_n rozpoznawanej przez enzym, jak i w obrębie grupy odchodzącej, funkcjonującej także jako reszta specyficzna względem wnęki S1'.⁸⁷ Na przykład podstawniki P1'

z pierścieniem aromatycznym są dyskryminowane przez kalpainy.⁹⁹ Z kolei przyłączenie podstawników polarnych, takich jak ugrupowanie $-\text{CF}_3$, do pierścienia benzenowego, który jest konserwatywnym fragmentem reszty P1' wielu inhibitorów tej grupy, znacznie zwiększa ich aktywność wobec katepsyny B *in vivo* (tabela 1.6).¹⁰⁰

Tabela 1.6: Aktywność nieodwracalnych acyloksymetylowych inhibitorów katepsyn. W tabeli podano także wartości $\text{p}K_a$ grup odchodzących. Stała k_2 – stała szybkości drugiego rzędu

Nr	Wzór inhibitora	$\text{p}K_a$	enzym	k_2 [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
45	Z-Phe-Ala-CH ₂ -O-CO-(2,6-(CF ₃) ₂)-Ph	0,58	kat B	1600000 ⁸⁷
			kat L	332000 ⁹
			kat S	364000 ⁹
46	Z-Phe-Ala-CH ₂ -O-CO-(2,5-(CF ₃) ₂)-Ph	2,63	kat B	38000 ⁸⁷
			kat L	2400 ⁹
			kat S	4700 ⁹
47	Z-Phe-Ala-CH ₂ -O-CO-(2,6-Me ₂ -4-COOMe)-Ph	2,67	kat L	3600 ⁹
			kat S	42000 ⁹
			kat B	610 ⁸⁷
48	Z-Phe-Ala-CH ₂ -O-CO-4-NO ₂ -Ph	3,43	kat L	44000 ⁹
			kat S	3300 ⁹
49	Z-Phe-Ala-CH ₂ -O-CO-(2,4,6-Me ₃)-Ph	3,45	kat B	14000 ⁸⁷
			kat L	4200 ⁹
			kat S	500 ⁹
50	Z-Phe-Ala-CH ₂ -O-CO- <i>t</i> -Bu	5,03	kat B	330 ⁹
			kat L	7800 ⁸⁷
			kat S	2700 ⁸⁷
51	Z-Phe-Ser(OBzl)-CH ₂ -O-CO-(2,6-(CF ₃) ₂)-Ph	BD*	kat B	2600000 ⁸⁷
			kat L	4290000 ⁹
			kat S	52000 ⁹
52	Z-Phe-Cys(SBzl)-CH ₂ -O-CO-(2,6-(CF ₃) ₂)-Ph	BD	kat B	2900000 ⁸⁷
			kat L	10700000 ⁹
			kat S	1550000 ⁹

* BD – brak danych

Przykładem efektywnej optymalizacji sekwencji aminokwasów w celu poprawienia selektywności są acyloksymetylowe inhibitory enzymu konwertującego interleukinę-1 (tabela 1.7). Są to pochodne z resztą Asp w pozycji P1.^{87,101} Ciekawostką jest, że inhibitor **53** posiadający tylko jeden aminokwasowy podstawnik P1 wykazuje relatywnie wysoką aktywność $7100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, podczas gdy jego glutaminianowy analog **56**

w ogóle nie hamuje enzymu konwertującego interleukinę-1. Brak inhibicji w przypadku pochodnej **56** pozostaje w zgodzie z potwierdzoną eksperymentalnie tezą, że ligandy muszą zawierać w strukturze przynajmniej dwie reszty w sekwencji rozpoznawanej przez enzym, aby inhibować endopeptydazy cysteinowe z szybkością powyżej 1000 $M^{-1}s^{-1}$.⁸⁷ Natomiast aktywność inhibitora **53** odbiega od tego schematu.

Tabela 1.7: Aktywność inhibitorów acyloksymetyloketonowych selektywnych względem ICE, enzymu konwertującego interleukinę-1, zestawiona z efektem inhibitorowym wywieranym na katepsynę B oraz porównanie aktywności ligandów zawierających jedną lub więcej reszt Pn względem ICE

Nr	Wzór inhibitora	$k_2 [M^{-1}s^{-1}]$ ICE	$k_2 [M^{-1}s^{-1}]$ kat B
53	Z-Asp-CH ₂ -O-CO-(2,6-Cl ₂ -Ph)	7100	<10
54	Z-Val-Asp-CH ₂ -O-CO-(2,6-Cl ₂ -Ph)	41000	380
55	Z-Val-Ala-Asp-CH ₂ -O-CO-(2,6-Cl ₂ -Ph)	407000	2250
56	Z-Glu-CH ₂ -O-CO-(2,6-Cl ₂ -Ph)	brak inhibicji	nie badano

Porównanie struktur adduktów enzym-inhibitor otrzymanych z udziałem chlorometyloketonów i acyloksymetyloketonów przy pomocy technik NMR wskazuje na podobny mechanizm inaktywacji. W obu przypadkach reakcja inhibitora z enzymem zachodzi prawdopodobnie poprzez tetraedryczny hemitioketal, a jej produktem jest β -ketotioeter. Przy czym, o ile te pierwsze należy zaliczyć do grupy reaktywnych substancji znakujących wskutek powinowactwa do enzymu, te drugie, ze względu na ich ukierunkowaną i obniżoną reaktywność, uznaje się za „quiescent affinity labels”.¹⁰²

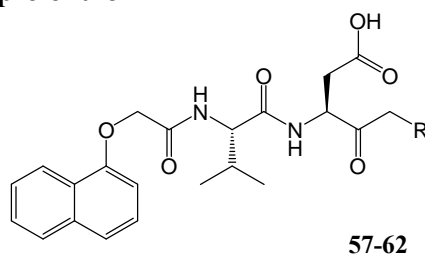
Uważa się, że dobry inhibitor, który reaguje z enzymem z odejściem grupy opuszczającej, powinien charakteryzować się wartością stałej pK_a takiej grupy poniżej 4. Wiele spośród przebadanych acyloksymetyloketonów nie spełnia tego kryterium, co tłumaczy ich obniżoną aktywność względem docelowych białek (tabela 1.6).⁸⁷

Ponieważ nie ma wyraźnych zależności między aktywnością *in vitro* i *in vivo* w tej klasie związków, przy projektowaniu potencjalnych leków na ich bazie należałoby zwrócić uwagę na ich dystrybucję w organizmie oraz możliwe przemiany metaboliczne. Obiecującą grupę związków, które opracowywano jako inhibitory kaspaz z uwzględnieniem m.in. przenikalności przez błony komórkowe, otrzymano wychodząc ze struktury 1-naftyloksyacetylo-Val-Asp-elktrofil. W tej grupie znalazły się, obok opisanego w podrozdziale 1.4.7 fluorometyloketonu **42**, acyloksymetyloketony **57-62**

(tabela 1.8). Okazały się one efektywnymi inhibitorami kaspaz, enzymów uczestniczących w procesie śmierci komórkowej oraz stanach zapalnych.⁸⁵

Badano ich aktywność w trzech modelach komórkowych osiągając dobre rezultaty. Powodem ich skuteczności są szczególne właściwości grupy odchodzącej. Można tu wymienić wystarczającą aktywność przy zachowaniu pewnej selektywności ugrupowania wiążącego katalityczną resztę Cys i lipofilowość, która zapewnia dobrą przenikalność przez błony biologiczne. Obecność atomu fluoru w podstawnikach pierścienia benzenowego dodatkowo poprawia parametr przenikania przez błonę komórkową.

Tabela 1.8: Aktywność antykaspazowa inhibitorów opartych na strukturze 1-naftyloksyacylo-Val-Asp-elektrofil

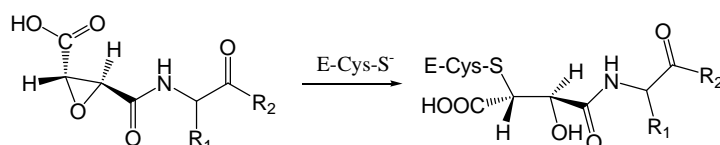


Nr	R	Stała szybkości inhibicji k_i/K_i [$M^{-1}s^{-1}$]				Testy komórkowe IC_{50} [μM]		
		Kasp 1	Kasp 3	Kasp 6	Kasp 8	Con A	monocyty	Jurkat
57	OCO(2,6-Cl ₂ -Ph)	52 109	725 222	56 883	17 010	2,15	11,50	10,61
58	OP(O)(Ph) ₂	142 948	350 785	39 714	59 312		3,48	18,42
59	OPh	3 630	19 152	2 399	4 258	38,00	11,17	13,98
60	O(2,4,6-F ₃ -Ph)	20 681	114 035	5 144	9 076	2,35	14,87	6,84
61	O(2,3,5,6-F ₄ -Ph)	77 528	267 953	78 887	30 173	2,17	6,25	4,50
62	O(2,3,4,5,6-F ₅ -Ph)	14 675	56 615	13 576	8 040		8,89	3,05

1.4.10 Pochodne kwasu epoksybursztynowego

Wyizolowanie w 1978 przez Hanadę i współpracowników¹⁰³ silnego nieodwracalnego inhibitora papainy z ekstraktu kultury *Aspergillus japonicus* można uznać za początek nowego rozdziału w badaniach nad inhibitorami proteaz cysteinowych. Wyodrębnioną substancję zidentyfikowano jako 1-[[N-(L-3-E-karboksyoksiran-2-karbonylo)-L-leucylo]-amino]-4-guanidynobutan, E-64 (**63**, rysunek 1.7).¹⁰⁴ W szeregu badań potwierdzono, że reaktywnym fragmentem w cząsteczce E-64 odpowiedzialnym za inhibicję proteaz tiolowych jest reszta kwasu E-(S,S)-epoksybursztynowego.¹⁰⁶ Okazuje się, że pozostałe stereoizomery E-64 są

zdecydowanie mniej aktywne, co wskazuje na preferowanie przez enzymy ligandów o określonej budowie stereochemicznej. W przeciwieństwie do większości inhibitorów izolowanych z mikroorganizmów, peptydowe pochodne kwasu epoksybursztynowego hamują wyłącznie proteazy cysteinowe i w warunkach fizjologicznych nie reagują z prostymi tiolami.^{103,105} Mechanizm inhibicji papainy zaproponowany na podstawie badań z użyciem spektroskopii NMR uwzględnia atak katalitycznej reszty cysteiny na atom C-3 pierścienia oksiranowego i w efekcie otwarcie epoksydu z inwersją konfiguracji na tym atomie (schemat 1.9).¹⁰⁷



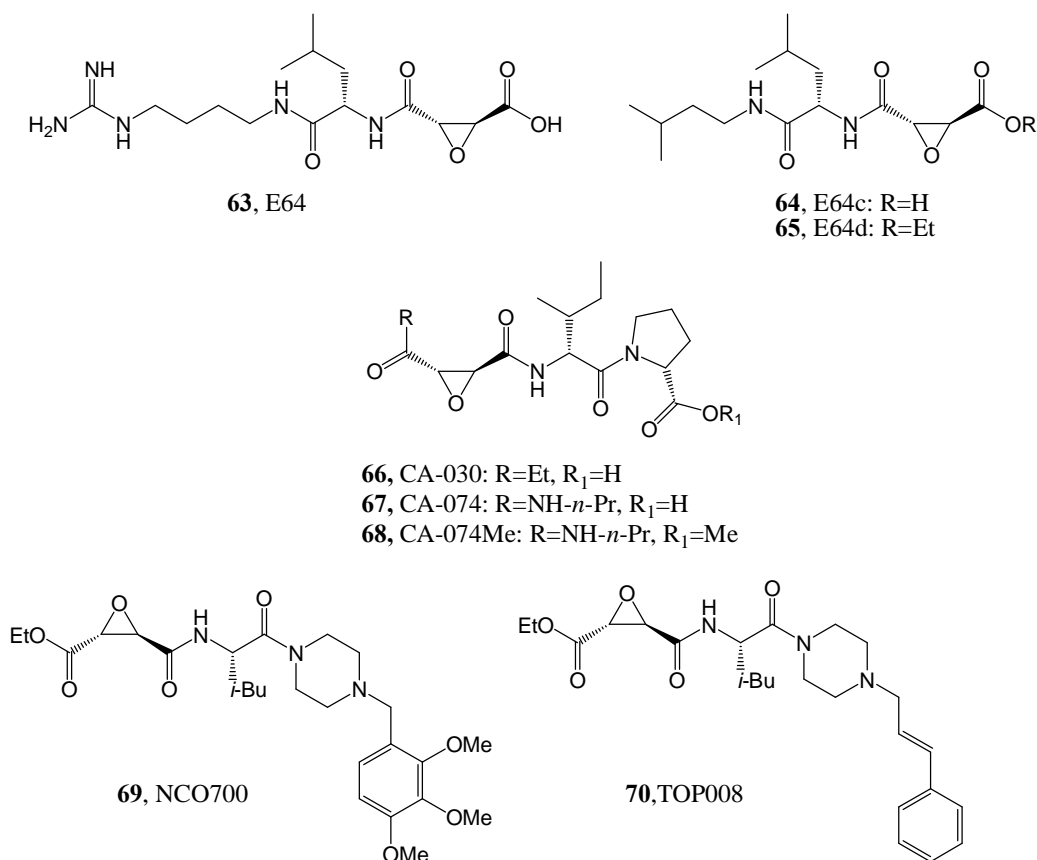
Schemat 1.9: Mechanizm inhibicji proteaz cysteinowych pochodnymi kwasu epoksybursztynowego

Sposób wiązania się analogów E-64 z proteazą różni się w zależności od budowy centrum aktywnego docelowego enzymu. W przypadku papainy reszta Leu **63** (E-64), **64** (E-64c) i **65** (E-64d) oddziałuje z wnęką S2, a pierścień epoksydowy otwiera się wskutek ataku reszty Cys na atom C3, co powoduje, że związany inhibitor ma orientację przeciwną do przyjmowanej przez peptydowy substrat.¹⁰⁸ Pochodne epoksybursztynylo-Ile-Pro (**66**, CA-030; **67**, CA-074; **68**, CA-074Me, rysunek 1.7) wiążą się z kolei z wnękami Sn' katepsyny B. Warunkiem selektywności inhibitorów względem tej proteazy jest wolna grupa karboksylowa C-końcowej reszty proliny.^{109,110} Ma ona wówczas możliwość oddziaływania z resztami His110 oraz His111, które są odpowiedzialne za egzopeptydazową aktywność katepsyny B.^{109,111}

Derywatywacja wolnej reszty karboksylowej we fragmencie epoksydowym prowadzi do upodobnienia obu stron inhibitora, co zwiększa prawdopodobieństwo ataku nukleofila również na atom C-2 pierścienia.¹¹¹

Wysoka selektywność pochodnych **66**, **67** i **68** względem katepsyny B skłaniała do poszukiwań innych pochodnych E-64, które wykazywałyby podobną selektywność względem określonej katepsyny. Okazało się, że poza związkami, których strukturę oparto na wzorze epoksyd-Ile(Leu)-Pro, pochodne E-64 nie wykazują preferencji wobec określonej hydrolazy klanu CA. Niemniej, jako związki selektywne względem proteaz cysteinowych są cennymi narzędziami w badaniach nad określeniem fizjologicznej roli

różnych enzymów z tej rodziny.¹¹²⁻¹¹⁵ Z tych samych powodów w obrębie tej klasy związków poszukiwano struktur wiodących dla nowych farmaceutyków.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Wiele spośród nich w procesie opracowywania leku dotarło do etapu prób klinicznych.



Rysunek 1.7: Struktury naturalnego, epoksybursztynowego inhibitora E64 oraz zaprojektowanych na jego podstawie inhibitorów proteaz cysteinowych

Pochodna **65** stosowana jako prolek **64** w leczeniu dystrofii mięśniowej osiągnęła etap III fazy badań klinicznych w Japonii.¹¹⁹ W 1992 roku zaniechano dalszych prac po odkryciu hepatotoksycznych właściwości związku w badaniach na szczurach.¹²⁰ Wyniki testów, w których epoksyd **63** wywołał efekt teratogeny w embriogenezie zarodków szczurzych zdecydowały o jego dyskwalifikacji z dalszych badań farmakologicznych.¹²¹

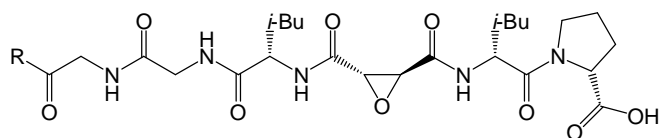
Modyfikacja inhibitora **67** polegająca na estryfikacji grupy karboksylowej prolina zdecydowanie poprawia przenikanie cząsteczki przez błony komórkowe. Prowadzi jednakże do utraty specyficzności. Związek **68** jest aktywny nie tylko wobec katepsyny B, ale także innych katepsyn lizosomalnych, np. katepsyny L. Jako słaby

i niespecyficzny inhibitor lizosomalnych proteaz cysteinowych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, ma raczej małe szanse na wdrożenia farmakologiczne.¹²²

Interesujące rezultaty osiągnięto projektując epoksydowe inhibitory zawierające pierścień piperazynowy (rysunek 1.7), które pierwotnie miały hamować katepsynę B i kalpainy aktywne w różnych schorzeniach układu sercowo-naczyniowego, np. w zawale serca.¹¹ Okazało się, że zarówno **69** (NCO-7000), jak i jego pochodna **70** (TOP-008), są skutecznymi związkami przeciwnowotworowymi. Właściwości te wykazano w testach *in vitro* i *in vivo* przeprowadzonych na ludzkich nowotworach prostaty i piersi.

Związek **70** indukował kaskadę kaspaz prowadzącą do apoptozy. Pochodna **69** w testach toksykologicznych prowadzonych na gryzoniach i psach oraz w pierwszej fazie badań klinicznych z udziałem ludzi okazał się związkiem dobrze tolerowanym, niewykazującym właściwości toksycznych.¹²³ Obecnie jest on w II fazie badań klinicznych.¹²⁴ Istnieją jednak przesłanki, że mechanizm działania tych pochodnych na poziomie molekularnym nie polega na inhibicji proteaz cysteinowych.

Próby zsyntezowania nowych inhibitorów oddziałujących specyficznie z resztami Sn i Sn' katepsyny B doprowadziły do odkrycia skutecznych pochodnych **71-74** (rysunek 1.8).¹²⁵⁻¹²⁷



71-74

- 71**, R = MeO
- 72**, R = (rodamina B)-NH-(CH₂)₆-NH
- 73**, R = biotyna-NH-(CH₂)₆-NH
- 74**, R = β-cyklodekstryna-NH-C(O)(CH₂)₅-NH

Rysunek 1.8: Pochodne epoksydowe zaprojektowane jako związki do badań funkcji katepsyn B wewnątrz i na zewnątrz komórki

Związek **71** specyficznie wiąże się z fragmentem 46-48 katepsyny B swoją częścią Pn, a jego sekwencja po stronie Pn' jest zgodna z sekwencją znanych substratów katepsyny B. Katepsyna B jest inaktywowana tym inhibitorem ze stałą szybkości drugiego rzędu równą $1520000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, podczas gdy stała szybkości inhibicji dla katepsyny L osiąga wartość $1204 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Przy okazji omawiania związku **71** warto

pokazać jeszcze jeden interesujący aspekt projektowania ligandów o określonych właściwościach. Jedną z cech struktury **71** po zadokowaniu w cząsteczce enzymu jest eksponowanie *N*-końcowej reszty Gly na powierzchni proteazy. Dzięki temu możliwe jest przyłączanie różnych grup efektorowych do podstawowego szkieletu inhibitora bez wpływania na aktywność i specyficzność cząsteczki. W taki sposób, po dołączeniu na *N*-końcu odpowiednio rodaminy i biotyny, otrzymano dwie pochodne (**72**, **73**) znakujące na skutek powinowactwa do enzymu. Przyłączenie do **71** cząsteczki β -cyklodekstryny prowadzi do struktury **74**. Podobnie jak związek **71**, pochodna **74** nie przenika przez błony komórkowe wystarczająco efektywnie, by w docelowej komórce spowodować całkowitą inaktywację lizosomalnej katepsyny B. Jedynymi celami, jakie osiąga w stężeniu efektywnym, są cząsteczki katepsyny B związane z błoną lub zewnątrzkomórkowe.

Dołączony fragment cyklodekstrynowy umożliwia tworzenie kompleksów inkluzyjnych inhibitora i wychwyconej cząsteczki. Kompleks z substancją aktywną, np. cytotoksycznym metotreksatem może docierać dzięki temu do określonych miejsc ograniczając pulę komórek uszkodzonych przez lek. Dzięki połączeniu związku **71** z heptapeptydem penetratyny otrzymano inhibitor o znacznie poprawionej przenikalności przez błony przy w pełni zachowanej aktywności cząsteczki (tabela 1.9, **75**). W odróżnieniu od opisanych pochodnych kwasu epoksybursztynowego **65**, czy **68**, które jako proleki wymagały wewnątrzkomórkowej aktywacji poprzez hydrolizę estrowej grupy ochronnej, związek zawierający w strukturze heptapeptyd penetratyny z dużą skutecznością przenikał przez błony komórek MCF-7 jako aktywny inhibitor. Wszystkie opisane pochodne tworzą kompleksowy „zestaw narzędzi” do badań funkcji komórkowych i pozakomórkowych izoform katepsyny B.

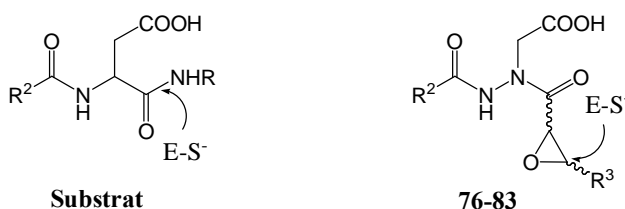
Tabela 1.9: Stałe szybkości drugiego rzędu inhibicji katepsyn B i L sfunkcjonalizowanymi peptydowymi pochodnymi epoksybursztynianowymi

Nr	Katepsyna B [M ⁻¹ s ⁻¹]	Katepsyna L [M ⁻¹ s ⁻¹]
71	1 520 000	1,204
72	1 530 000	323
73	1 726 000	256
74	1 050 000	393
75*	6 100 000	3 590

75* - pochodna z dołączonym heptapeptydem penetratyny

Dzięki swojej stabilności, wysokiej aktywności i zazwyczaj dobrej przenikalności do komórek opisane inhibitory z resztą epoksybursztynianu okazały się bardzo użyteczne w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* z udziałem peptydaz klanu CA. Potwierdzono ich skuteczność w redukowaniu objawów chorobowych w zwierzęcych modelach wielu schorzeń kojarzonych z aktywnością tych białek, w tym dystrofii mięśniowej, niedokrwinnym uszkodzeniu neuronów, zakażeniu *Leishmania major*, osteoporozie i nowotworach.¹²⁸

Najlepiej przebadane pochodne E-64 wykazywały raczej umiarkowaną lub niską aktywność względem proteaz z klanu CD. Dlatego, chcąc wykorzystać wymienione walory pochodnych epoksybursztynianu, podjęto próby zaprojektowania ligandów epoksydowych, które zapełniłyby lukę w grupie potencjalnych leków działających poprzez inhibicję innych niż kalpainy czy katepsyny enzymów uczestniczących w procesach zapalnych oraz śmierci komórkowej. W 2004 roku ukazała się praca dotycząca azaepoksydowych inhibitorów kaspaz o wzorze ogólnym jak na rysunku 1.9.¹²⁸



	R²	R³
76	PhCH ₂ CH ₂ C(O)-Val-Ala	C(O)NHCH ₂ Ph
77	PhPr-Val-Ala	CO-Phe-NH ₂
78	Cbz-Asp-Glu-Val	COOEt
79	Cbz-Asp-Glu-Val	COOCH ₂ Ph
80	Cbz-Asp-Glu-Val	COOEt
81	Cbz-Asp-Glu-Val	CONHCH ₂ CH ₂ Ph
82	Cbz-Ile-Glu-Thr	COOCH ₂ Ph
83	Cbz-Ile-Glu-Thr	COOCH ₂ Ph

Rysunek 1.9: Azaepoksydowe inhibitory kaspaz o sekwencji reszt w części peptydowej (R²) zaprojektowanej w oparciu o strukturę preferowanych substratów oraz postulowany mechanizm inhibicji

Opisano w niej nową klasę związków, które uzupełniają krótką dotychczas listę skutecznych, nieodwracalnych inhibitorów kaspaz. Znalazły się one na niej obok halometryloketonów, acyloksymetyloketonów oraz diazometryloketonów. Ich otrzymanie znacznie zwiększa możliwości badania fizjologicznej roli kaspaz z użyciem

znakowanych sond działających w oparciu o mechanizm inhibicji. Powszechnie stosowane dotychczas do tego celu halometryloketony cechuje ograniczona selektywność. Nawet związki projektowane jako inhibitory kaspaz wykazują aktywność wobec katepsyn, papainy i leguminazy. Ze względu na wysoką reaktywność sprawdzają się one raczej jako sondy znakujące przy wstępnym modelowaniu wnętrza wiążących enzymów. Natomiast nie nadają się do precyzyjnego określania funkcji wybranej kaspazy, co prawie całkowicie wyklucza również ich użycie w terapii bazującej na selektywnej inaktywacji jednej z nich. Ogólnie niewielka liczba przebadanych związków, których przydatność w badaniach nad funkcją proteaz tak ważnych jak kaspazy nie budzi zastrzeżeń, dobitnie przemawia za koniecznością poszukiwania nowych pochodnych o odpowiedniej charakterystyce. W świetle aktualnych doniesień aza-epoksydy uznaje się za bardzo obiecującą klasę inhibitorów, wśród których można poszukiwać związków wiodących dla nowych leków.

Struktura azaepoksydowych pochodnych peptydów (rysunek 1.9) naśladuje budowę substraty, a dokładniej odpowiada ich części od *N*-końca w kierunku hydrolizowanego wiązania. Podczas wiązania z enzymem reaktywny elektrofilowy fragment cząsteczki alkiluje katalityczną resztę cysteiny, podobnie jak dzieje się to w przypadku innych kowalencyjnych inhibitorów proteaz cysteinowych. W zależności od budowy *C*-końca, możliwe są różne jego modyfikacje pozwalające na optymalizację oddziaływań liganda z wnętrzem *S'* enzymu. Sekwencję rdzeni peptydowych dla nowych inhibitorów zdefiniowano w badaniach wstępnych z użyciem odpowiednich wzorcowych substratów. Wspólną ich cechą jest reszta Asp w pozycji P1. Stałe inhibicji k_2 kaspaz 2, 3, 6 i 8 tymi związkami osiągały wartości do $1,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Najbardziej optymalne okazały się sekwencja Val-Ala-aza-Asp dla kaspazy 1, Asp-Glu-Val-aza-Asp dla kaspazy 3, Ile-Glu-Thr-aza-Asp dla kaspazy 6 i Leu-Glu-Thr-aza-Asp dla kaspazy 8. W celu zbadania specyficzności wnętrza *S'* oraz możliwości wpływania na selektywność cząsteczek poprzez zmiany w obrębie części P' inhibitorów, fragment epoksydowy związków modyfikowano resztami alkilowymi, aryłowymi, estrowymi i amidowymi (rysunek 1.9, podstawnik R^3). Ocenie poddano ogólną skuteczność otrzymanych pochodnych, ich selektywność w zależności od sekwencji aminokwasów oraz budowy podstawnika R^3 , a także stabilność w warunkach testu i niespecyficzną aktywność względem innych proteaz klanu CD.

Najlepszym inhibitorem kaspazy 1 okazał się związek **76** (tabela 1.10). Charakterystycznym elementem jego budowy jest podstawnik P4 (reszta kwasu

fenylopropionowego), który korzystnie oddziałuje z wnęką S4. Jest to ogólna tendencja wśród analogicznych inhibitorów wskazująca na hydrofobowy charakter tej kieszeni wiążącej. Największą selektywność względem kaspazy 1 przy zachowanej wysokiej aktywności wykazywała pochodna **77** będąc od kilkudziesięciu do kilkuset razy bardziej aktywna względem kaspazy-1 niż wobec kaspaz 3, 6 i 8 (odpowiednio 50, 500 i 80 razy). Podobną selektywność, jednak przy zdecydowanie mniejszej aktywności wykazywały wszystkie związki z badanej serii z resztą aminokwasową w pozycji P1'. Reaktywność pochodnych zaprojektowanych dla kaspazy 1 w zależności od struktury podstawnika R³ maleje w szeregu CONHCH₂Ph > COOCH₂CH₂Ph ≥ COOCH₂Ph > CO-Phe-NH₂ ≥ COOEt > CO-Leu-NH₂ > CONHCH₂CH₂Ph > CO-Ala-NHCH₂Ph ≥ CONHCH₂CH(OH)Ph > CO-Tyr-NH₂ > CH₂CH₂Ph. Zauważono, że dla pochodnych z amidowymi podstawnikami R³ istnieją wyraźne różnice w reaktywności wobec kaspazy 1. Natomiast nie rejestruje się zróżnicowanej aktywności tych związków względem pozostałych kaspaz. Niektóre cząsteczki z fragmentem amidowym w części P' wykazują wysoką aktywność względem kaspazy 1, ale także nie do pominięcia jest ich potencjał inhibitorowy względem kaspazy 8. Z kolei ligandy z ugrupowaniem estrowym w tej części hamują przede wszystkim kaspazę 1.

Tabela 1.10: Aktywność azaepoksydowych pochodnych peptydów względem wybranych kaspaz; (Pierścień oksiranowy pochodnych 76-82 ma konfigurację S,S, a w pochodnej 83 R,R)

Nr	Stała szybkości inhibicji k_i/K_i [$M^{-1}s^{-1}$]			
	Kasp 1	Kasp 3	Kasp 6	Kasp 8
76	65 900	1610	155	9360
77	32 700	625	65	390
78	11 800	1 070 000	5 440	95 500
79	54 700	1 910 000	12 700	188 000
80	58 500	50 500	4 180	195 000
81	41 100	27 300	3130	72 700
82	45 800	9 500	86 200	58 500
83	13 000	3 110	45 400	4 560

Wyniki zebrane w tabeli 1.10 wskazują na związek **79** jako najskuteczniejszy azaepoksyd inhibitujący kaspazę 3. W części peptydowej zawiera on cztery reszty aminokwasowe. Próby skracania tej sekwencji w celu usprawnienia procesu przygotowania ligandów do optymalizacji fragmentu P' znacznie obniżało aktywność cząsteczek względem kaspazy 3, a jednocześnie powodowało jej wzrost względem kaspazy 1 i 8 (**80** i **81**). Wskazywało to na istotną rolę reszty P4 (Asp) w kształtowaniu

selektywności ligandów tej hydrolazy. Generalnie, silnie wiązane inhibitory kaspazy 3 wykazywały również pewną aktywność względem kaspaz 1 i 8, ale pozostawały znacznie mniej aktywne wobec kaspazy 6. Preferowany podstawnik P4 ligandów omawianej kaspazy powinien posiadać niezerowy ładunek, podczas gdy w przypadku kaspazy 8 wymagana jest obojętna, rozgałęziona reszta alifatyczna. Porządek reaktywności azaepoksydowych inhibitorów kaspazy 3 w zależności od rodzaju podstawnika R³ kształtuje się następująco COOCH₂Ph > CONHCH₂Ph ≥ COOEt > CO-Ph-NH₂. Zmiana reszty alkoholowej podstawnika estrowego R³ z etylowej (**78**) na benzyłową (**79**) wywołuje prawie dwukrotny wzrost aktywności. Ta modyfikacja poprawia parametry kinetyczne inhibicji wszystkich testowanych enzymów, a więc nie przyczynia się do wzrostu selektywności.

Porównano skuteczność **79** oraz chlorometyloketonu o tej samej sekwencji reszt aminokwasowych. W obu przypadkach osiąga się wartość k_2 rzędu 10⁶ M⁻¹s⁻¹, przy czym selektywność pochodnej azaepoksydowej jest znacznie wyższa.

Najszybszy spadek aktywności kaspazy 6 wywołuje wiązanie związku **82**. Jest on jednak nieselektywnym inhibitorem, który inaktywuje również kaspazę 1 i 8. Poprawę selektywności uzyskano w przypadku enancjomeru **83**. Inaktywuje on kaspazę 6 dziesięciokrotnie szybciej niż kaspazę 8 i ponad trzykrotnie szybciej niż kaspazę 1. Porządek w szeregu reaktywności inhibitorów kaspazy 6 w zależności od budowy podstawnika R³ odpowiada kolejności w szeregu inhibitorów kaspazy 3: COOCH₂Ph > CONHCH₂Ph ≥ COOEt > CO-Ala-NH-CH₂Ph.

Najskuteczniejszym inhibitorem kaspazy 8 był związek **80** zaprojektowany pierwotnie jako inhibitor kaspazy 3. Był on również aktywny względem kaspazy 1. Stała szybkości k_2 miała w tym przypadku wartość odpowiadającą wartości otrzymanej dla związku zaprojektowanego na bazie sekwencji rozpoznawanej przez kaspazę 1. Zaskakująca była obserwacja, że najefektywniejszymi inhibitorami kaspazy 8 są pochodne oparte na sekwencji aminokwasów preferowanej przez kaspazę 3 (Asp-Glu-Val-Asp): k_2 od 73000 do 195 000 M⁻¹s⁻¹, a nie inhibitory o przewidywanej optymalnej sekwencji Leu-Glu-Thr-Asp ($k_2 = 35000-75000$ M⁻¹s⁻¹). Z kolei związki zbudowane na szkieletcie aminokwasowym rozpoznawanym przez kaspazy 6 i 8 o wysokiej aktywności względem tych enzymów, są reaktywne względem kaspazy 1, podczas gdy kaspazę 3 inaktywują znacznie słabiej. Szereg reaktywności ustalony w oparciu o wyniki inhibicji dla pochodnych z różnymi podstawnikami R³ jest następujący: COOCH₂Ph > COOEt > CONHCH₂CH₂Ph > CO-Ala-NH-CH₂Ph.

Opisując nowe azapeptydowe pochodne epoksybursztynianu należy podkreślić, że okazały się one wysoce selektywne względem kaspaz i nie wykazywały znaczącej aktywności względem innych hydrolaz z klanu CD, ani też nie hamowały proteaz z klanu CA, czy serynowych. Dodatkowo cechuje je wysoka stabilność w roztworach używanych do pomiarów kinetycznych ($t_{1/2}$ kilka godzin), a także w okresie dłuższego przechowywania w obniżonej temperaturze w postaci zateżonej. Tak obiecujący profil omawianej grupy inhibitorów zachęca do dalszych prac nad przystosowaniem otrzymanych związków do badań fizjologicznych. Przede wszystkim należy zredukować peptydowy charakter części Pn ligandów, a także zastąpić ugrupowanie karboksylowe fragmentu epoksybursztynowego dogodniejszym izosterem w celu poprawienia parametru przenikania przez błony biologiczne oraz zmniejszeniu ryzyka degradacji przez proteazy.

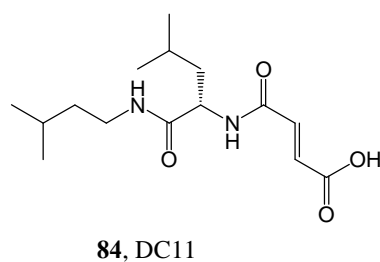
1.4.11 Pochodne nienasycone - akceptory typu Michael'a

Jedną ze znanych metod otrzymywania epoksydów jest utlenienie odpowiedniej pochodnej z ugrupowaniem C=C. Nienasycone prekursorzy oksiranów, podobnie jak produkty ich regioselektywnego utlenienia są podatne na atak nukleofilowy.¹⁰⁵ Z tego względu można je wykorzystać jako inhibitory proteaz cysteinowych. Wstępne badania nad tą klasą związków objęły analogi **64**, w których reszta kwasu epoksybursztynowego została zastąpiona resztą kwasu fumarowego **84** (np. DC-11, tabela 1.11). Porównywano szybkości reakcji par cząsteczek: fumaranu i epoksybursztynianu oraz **64** i **84** z cysteiną. Wykazano podobną reaktywność formy utlenionej i nienasyconej z pierwszej pary, natomiast związek DC-11 wiązał się 100 razy wolniej od swojego eposydowego analogu. W odniesieniu do *N*-etylomaleimidu - klasycznego inhibitora proteaz cysteinowych – DC-11 wykazywał wyższą aktywność. Podobne wyniki uzyskano dla nienasyconych analogów substratów papainy i katepsyny C.^{130,131}

Postulowany mechanizm inhibicji z udziałem omawianych pochodnych można było określić między innymi dzięki obserwacji, że aktywne są tylko te związki, które w sąsiedztwie wiązania C=C mają grupę elektroakceptorową. Sugerowało to, że alkirowanie katalitycznej reszty cysteiny zachodzi zgodnie z mechanizmem addycji nukleofilowej. Większość z najwcześniej badanych inhibitorów wykazywała wysokie powinowactwo do docelowych enzymów ($K_i = 26-220 \mu\text{M}$), ale była mało aktywna ze względu na bardzo wolny przebieg alkirowania ($k_i = 0,0018-0,015 \text{ s}^{-1}$). Znacznie

bardziej obiecujące wyniki uzyskano z udziałem winylosulfonowych pochodnych peptydów,^{132,133} dla których stała szybkości drugiego rzędu osiągała wartości rzędu $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Tabela 1.11: Aktywność wybranych akceptorów Michael'a wobec proteaz klanu CA

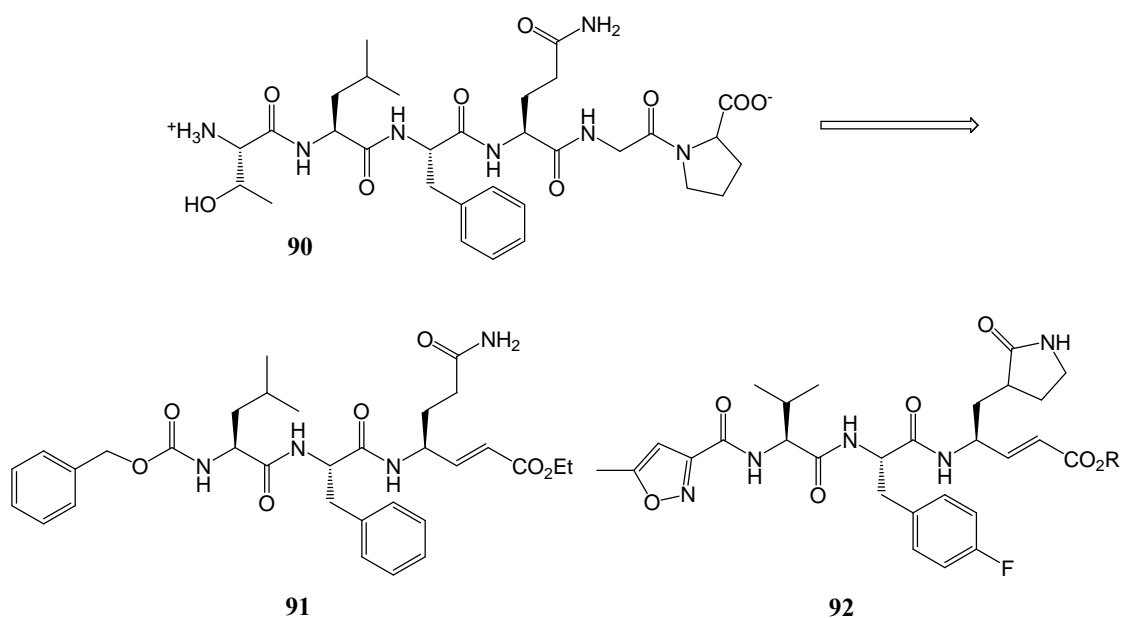


	Inhibitor	enzym	$k_2 [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
64	(<i>L,D</i>)	Papaina	32500 ⁹
64	(<i>L,D</i>)	Katepsyna B	3790
64	(<i>D,L</i>)	Papaina	38000
64	(<i>D,L</i>)	Katepsyna B	6900
84		Katepsyna B	625 ¹⁰⁵
84		Katepsyna H	11 ¹⁰⁵
84		Katepsyna L	2 272 ¹⁰⁵
85	Fum-Phe-OBzl	Papaina	0,5 ⁹
86	Fum-Ile-NH- <i>n</i> Bu	Papaina	47 ⁹
87	Fum-Ile-Pro-OBzl	Papaina	80 ⁹
88	<i>N</i> -etylomaleimid	Papaina	6322/2,7 ¹³⁴
88	<i>N</i> -etylomaleimid	Katepsyna B	1 ¹⁰⁵
89	Mu-Phe-hPhe-VsPh ¹³²	Katepsyna B	16 400
89	Mu-Phe-hPhe-VsPh ¹³²	Katepsyna L	224 000
89	Mu-Phe-hPhe-VsPh ¹³²	Katepsyna S	7 700 000

Mu = morfolinomocznik; hPhe = homofenyloalanina; VsPh = (winylo-sulfonylo)-benzen -CH=CHSO₂Phe

Możliwość wykorzystania inhibitorów z wiązaniem C=C w farmakologii została potwierdzona w badaniach nad proteazą HRV-3C^{PRO}. Występuje ona we wszystkich serotypach rinowirusów należących do rodziny patogennych pikornawirusów. Uważa się, że są one przyczyną ponad 50 % różnych postaci schorzeń układu oddechowego u ludzi, popularnie nazywanych przeziębieniami.¹³⁵ Enzym ten pełni kluczową rolę w cyklu rozwojowym wirusa. Jest białkiem wiążącym RNA odpowiedzialnym między innymi za jego replikację. Uczestniczy także w procesie dojrzewania pozostałych białek kodowanych przez wirusa.¹³⁶ Reagenty alkilujące, typu akceptorów Michael'a, opracowane na podstawie struktury substratu proteazy HRV-3C^{PRO} (**90**, rysunek 1.10), badano jako potencjalne leki antywirusowe w terapii chorób wywoływanych przez rinowirusy. Związkiem, który dotarł do fazy zaawansowanych prób klinicznych jest ruprintriwir (**92**). Jego podawanie wyraźnie zmniejszyło objawy zakażenia rinowirusami

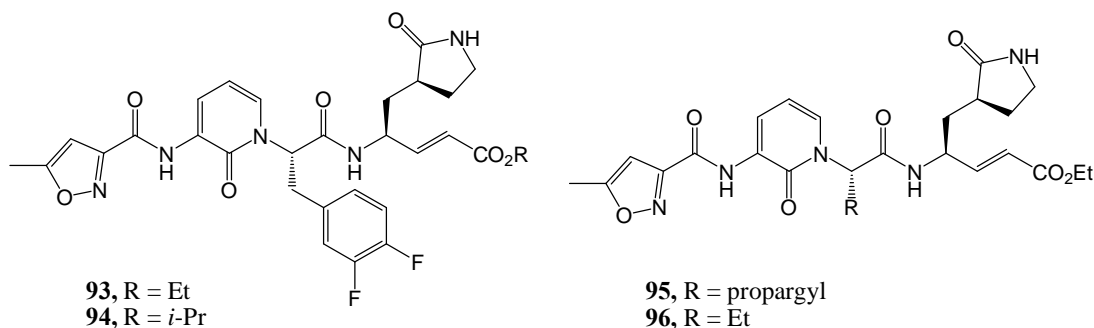
sztucznie wywoływanego u pacjentów poddanych badaniom. W wyniku jego stosowania zdecydowanie zmniejszała się ilość wydzieliny z nosa oraz liczebność obecnych w niej wirusów. Obecnie rupintriwir jest w fazie II/III prób klinicznych, w których ocenia się jego skuteczność w formie spreju do nosa.¹¹



Rysunek 1.10: Struktury przedstawiające wyniki różnych etapów badań nad otrzymaniem inhibitorów HRV14-3C^{PRO}; Pokazano związek wyjściowy **90** – znany substrat docelowego enzymu, opracowaną strukturę wiodącą **91** i zoptymalizowaną cząsteczkę rupintriwiru **92** (R = -H lub -Et). Hydroliza ugrupowania estrowego zachodząca w warunkach fizjologicznych obniża aktywność inhibitora 400 razy.

Istnieją przesłanki, z których wynika, że najlepszy efekt terapeutyczny w leczeniu infekcji wywoływanych przez rinowirusy można osiągnąć stosując inhibitory HRV-C3^{PRO} o dobrej biodostępności przy podaniu *per os*. Związki z grupy rupintriwiru, zawierające w strukturze resztę α,β -nienasyconego estru, okazały się niestabilne w surowicy laboratoryjnych gryzoni. Wykluczyło to możliwość wykorzystania szczurów i myszy jako modelowych zwierząt w badaniu biodostępności pochodnych rupintriwiru. Pewne dane farmakokinetyczne udało się zgromadzić w badaniach z wykorzystaniem psów. Otrzymane wyniki dyskwalifikowały badane związki jako składniki czynne preparatów doustnych. Wśród przyczyn niskiej skuteczności pochodnych rupintriwiru przyjmowanych drogą pokarmową wymienia się ich peptydowy charakter oraz obecność w ich strukturze ugrupowania estrowego podatnego na hydrolizę.

W celu otrzymania stabilniejszych związków hamujących HRV-3C^{PRO} o lepszej biodostępności wykorzystano metody modelowania molekularnego. W rezultacie otrzymano nową klasę peptydomimetyków (**93-96**, rysunek 1.11), w których podstawnik P3 zastąpiono resztą 2-pirydynonu. Zsyntezowane pochodne **93** i **94** okazały się aktywniejsze od rupintriwiru, ale tylko związek **94**, w którym C-końcówką grupę karboksylową zestyfikowano alkoholem izopropylowym, posiadał satysfakcjonujący profil farmakokinetyczny (tabela 1.12). Modyfikacje w obrębie łańcucha bocznego reszty P2 (pochodne **95** i **96**) przyczyniły się do minimalnego spadku aktywności w stosunku do rupintriwiru, ale zdecydowanie poprawiły biodostępność oraz stabilność inhibitorów *in vivo*.



Rysunek 1.11: Pochodne rupintriwiru z resztą 2-pirydynonu w pozycji P3 jako izosterem wiązania peptydowego.

Tabela 1.12: Wyniki badania aktywności oraz profilu farmakokinetycznego pochodnych rupintriwiru z resztą 2-pirydynonu w pozycji P3 *in vivo*.

Nr	EC_{50} [μ M]	Degradacja w mikrosomach wątroby ludzkiej po 30 min	Biodostępność, F [%]	$T_{1/2}$ w surowicy ludzkiej	C_7 [μ M]
92	0,013	T	8	BD	BD
93	0,001	80	NO	1,4h	NO
94	0,003	50	48 _p , 1 _m	9,7h	bn _m
95	0,058	BD	BD	BD	0,248 _p , 0,057 _m
96	0,047	BD	BD	BD	0,682 _p , 0,896 _m

NO, nie oznaczano; T, całkowita; p, badania na psach; m, badania na małpach; C_7 , stężenie w surowicy użytych w badaniu zwierząt po 7 godzinach od podania

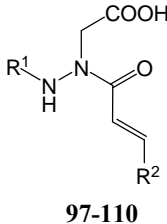
Opisane w poprzednim podrozdziale „azaepoksydy” zaprojektowane jako inhibitory kaspaz były otrzymane poprzez sprzężenie peptydu o preferowanej przez docelowy enzym sekwencji aminokwasów z przygotowanym wcześniej fragmentem zawierającym resztę epoksybursztynianu. Kierując się takimi samymi przesłankami,

jakie stanowiły punkt wyjścia dla badań nad „azaepoksydami”, grupa J. Powers’a¹³⁷ opracowała analogiczną metodę syntezy związków zawierających w strukturze resztę kwasu fumarowego (rysunek 1.12). Zakładano, że powinny one wykazywać reaktywność zbliżoną do ich utlenionych analogów i wzbogacić pulę znanych selektywnych inhibitorów kaspaz. Opracowując ich strukturę oparto się na wstępnych wynikach badań z zastosowaniem znakowanych substratów, w których ustalono sekwencje peptydów preferowanych przez każdą z kaspaz. Konserwatywnym fragmentem cząsteczek była reszta azaaspartylowa w pozycji P1, którą sprzęgano z resztą kwasu fumarowego odpowiednio zmodyfikowaną poprzez przyłączenie podstawnika R¹ (tabela 1.13). Podstawnik R¹ pełni taka samą rolę, jak w przypadku opisanych wyżej „azaepoksydów” – decyduje o selektywności liganda dzięki specyficznym oddziaływaniom z wnęką S1’ docelowego enzymu. Konstrukcja tych inhibitorów pozwala na ich łatwą rozbudowę po stronie P’, co gwarantuje dużą elastyczność w badaniach nad określeniem charakteru wnęk Sn’ badanych proteaz.

W celu zweryfikowania przydatności otrzymanych związków **97-110** w badaniach nad fizjologiczną rolą kaspaz oceniano ich aktywność, selektywność w zależności od sekwencji i rodzaju reszt peptydowego rdzenia oraz budowy podstawnika R². Badano także ich stabilność w roztworze w warunkach przechowywania oraz pomiarów kinetyki inhibicji i wreszcie niespecyficzną aktywność względem innych proteaz klanu CD oraz CA. W badaniach z udziałem kaspazy 2 ujawniono, że w odróżnieniu od pozostałych kaspaz wykazuje ona szczególne wymagania dotyczące reszty P5 ligandów. Preferowaną sekwencją jest Val-Asp-Val-Ala-Asp. Ponieważ badane związki zawierały krótszy fragment peptydowy o ich skuteczności zadecydowała względnie komplementarna do miejsca wiążącego sekwencja charakterystyczna dla substratów kaspazy 3 - AspGluValAsp, chociaż wyznaczone dla większości badanych pochodnych stałe k_2 oscylowały koło wartości rzędu tylko $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Najskuteczniejsze były związki **99** i **100** ze stałymi k_2 rzędu 10^4 i 10^3 (tabela 1.13). Są one izomerami geometrycznymi. Ciekawe jest, że izomer Z był aktywniejszy tylko względem kaspazy 2. Pozostałe kaspazy były skuteczniej hamowane przez izomer E. Wpływ podstawnika R² na aktywność cząsteczek ilustruje szereg: COOEt (Z) > COOEt (E) > CON(CH₃)CH₂Ph > CON(CH₂-1-naftoil)₂ > CON(CH₃)CH₂CH₂Ph > CPh > CONHCH₂-4-F-Ph > CONHCH₂CH₂Ph > CON(CH₂Ph)₂. Wynika z niego, że najlepszymi podstawnikami w resztach P’ ligandów kaspazy 2 są estry i dwupodstawione amidy.

Związek **103** okazał się najskuteczniejszym inhibitorem kaspazy 3 i kaspazy 7. Porównanie struktur przebadanych związków sugeruje, że zadecydowała o tym obecność w pozycji P1' dużego aromatycznego podstawnika. Taki podstawnik R² zawierały najbardziej aktywne inhibitory kaspazy 3 i 7 z peptydowym rdzeniem Asp-Glu-Val-Asp. Skrócenie o jedną resztę łańcucha peptydowego do Glu-Val-Asp znacznie obniża szybkość wiązania ligandów. Aktywne okazały się również pochodne zawierające na C-końcu (podstawnik R²) monopodstawiony amid, na przykład **101**. Otrzymane akceptory Michael'a są aktywniejsze od znanego chlorometyloketonu Cbz-Asp-Glu-Val-Asp-CH₂Cl ($k_2/K_i = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), a przy tym znacznie bardziej selektywne.

Tabela 1.13: Inaktywacja kaspaz azapeptydowymi pochodnymi kwasu fumarowego

	R ¹	R ²	
97	Cbz- Glu-Val	COOEt	97-110
98	Cbz-Asp-Glu-Val	COPh	
99	Cbz-Asp-Glu-Val	COOEt(Z)	
100	Cbz-Asp-Glu-Val	COOEt(E)	
101	Cbz-Asp-Glu-Val	CONHCH ₂ -4-F-Ph	
102	Cbz-Asp-Glu-Val	CON(CH ₂ Ph) ₂	
103	Cbz-Asp-Glu-Val	CON(CH ₂ -1-naftoil) ₂	
104	Cbz-Val-Glu-Val	COOEt	
105	Cbz-Ile-Glu-Thr	CONHPh	
106	Cbz-Ile-Glu-Thr	CON(CH ₃)CH ₂ Ph	
107	Cbz-Ile-Glu-Thr	CON(CH ₃)CH ₂ CH ₂ Ph	
108	Cbz-Leu-Glu-Thr	COOEt	
109	Cbz-Leu-Glu-Thr	CON(CH ₃)CH ₂ Ph	
110	Cbz-Leu-Glu-Thr	CON(CH ₃)CH ₂ -1-naftoil	

Nr	Stała szybkości inhibicji k_i/K_i [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]						
	Kasp 2	Kasp 3	Kasp 6	Kasp 7	Kasp 8	Kasp 9	Kasp 10
97	90	38 600	3 540	52 400	244 000	32 900	8 940
98	165	122 000	1 800	10 800	9 720	BD	930
99	26 200	1 060 000	11 000	139 000	181 000	BD	13 500
100	2 640	2 130 000	35 575	239 000	272 960	BD	49 900
101	130	2 100 000	4 400	329 000	85 100	900	37 700
102	110	3 100 000	5 100	359 000	8 600	450	6 300
103	410	5 620 000	29 700	875 000	9 640	150	32 500
104	115	41 200	83 600	3 650	175 800	340	6 600
105	365	7 030	99 200	920	245 000	940	9 210
106	95	6 000	45 900	390	59 700	845	8 500
107	38	5 480	BD	1 020	60 500	760	8 770
108	NI	5 560	18 700	NI	237 000	37	NI
109	140	6 000	10 800	520	169 000	4 320	8 430
110	290	11 200	21 700	1 100	179 000	5 030	13 600

Dużym problemem okazało się osiągnięcie selektywności inhibitorów kaspaz 6 i 8, głównie ze względu na podobieństwo ich wymagań substratowych. Najbardziej

skuteczny inhibitor kaspazy 6 (**105**) jest ponad dwukrotnie aktywniejszy względem kaspazy 8. Większość otrzymanych akceptorów Michael'a o sekwencjach preferowanych przez kaspazę 8 okazało się stosunkowo mało selektywnych, niezależnie od podstawnika R² (**106**, **107**). Również inhibitor **104** zaprojektowany dla kaspazy 6 hamował skutecznie nie tylko kaspazę 8, ale i 3.

Warta odnotowania jest obserwacja, że w omawianej serii związki z niewielkimi podstawnikami R², np. **108**, najskuteczniej inaktywowały kaspazę 8. W przypadku tego enzymu, kaspazy 9, a w pewnym stopniu także 10 i 6 skuteczny okazał się trójpeptyd **97**, dyskryminowany przez pozostałe docelowe hydrolazy. Ciekawostką jest, że jego tetrapeptydowy analog hamował kaspazę 9 tylko w niewielkim stopniu. Otrzymane wyniki inhibicji związkiem **97** pozwalają na pewne uogólnienie. Kaspazy 6, 8, 9 i 10 stanowią podzbiór o mniej zdefiniowanych preferencjach dotyczących reszty P4 w porównaniu do kaspaz 2, 3 i 7. Niemniej, obecność co najmniej trzech reszt aminokwasowych jest warunkiem koniecznym dla skutecznego oddziaływania liganda z enzymem, co wykazano osiągając bardzo niskie szybkości inaktywacji kaspaz analogami dipeptydowymi.

W podsumowaniu wyników badań nad selektywnością związków wymienionych w tabeli 1.13 potwierdzono korelację między wyższą aktywnością względem docelowego enzymu i obecnością w ich strukturze preferowanej przez kaspazę sekwencji aminokwasów. Odchylenia od tej reguły zarejestrowano w przypadku kaspaz 8, 9 i 10, które były skutecznie inhibitowane przez związki o sekwencji innej niż wynikająca z ich naturalnych wymagań substratowych. Warto zauważyć, że najbardziej selektywne inhibitory, chociaż charakteryzowały się raczej wysoką aktywnością, nie były najbardziej aktywne w swojej grupie. W przypadku kaspazy 3 był to związek **102**. Najbardziej selektywnym inhibitorem kaspazy 8 była pochodna **108** (tabela 1.13). Problem osiągnięcia selektywności poprzez manipulowanie sekwencją aminokwasów wynikający z podobnego zachowaniem kaspaz 3 i 7 oraz 8 i 10 wymaga dalszych badań nad możliwością jej kształtowania poprzez podstawnik R². Aktywność zaprojektowanych pochodnych **97-110** nie obejmowała natomiast proteaz z klanu CA oraz innych proteaz z klanu CD.

Stabilność omawianych akceptorów Michael'a w dużej mierze zależała od podstawnika R². W testach z prostymi tiolami, takimi jak ditiotreitól, prowadzonych w buforze do oznaczania resztkowej aktywności kaspaz, połówkowy czas życia inhibitorów wynosił kilka minut dla pochodnych estrowych, kilkadziesiąt dla

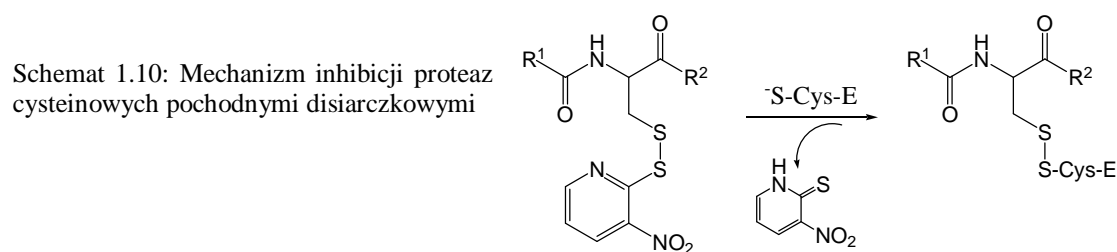
podstawionych amidów i kilkanaście godzin dla związków z alkiowym podstawnikiem R^2 .

Ponieważ atak nukleofila następuje na atom C2 ugrupowania $C=C$ opisywanych związków, do pewnego stopnia mogą być tolerowane modyfikacje atomu węgla C-3 tego fragmentu, co poszerza zakres możliwości wpływania na ich selektywność.

Podsumowując, opisane azapeptydowe akceptory Michael'a stanowią bardzo obiecującą klasę inhibitorów o potencjalnych zastosowaniach w precyzyjnych badaniach funkcji komórkowych kaspaz. W perspektywie, po odpowiednim opracowaniu dotyczącym przede wszystkim zmniejszenia ich peptydowego charakteru i optymalizacji fragmentu P' mających na celu poprawienie biodostępności i stabilności nie można wykluczać zastosowania tych związków w terapii schorzeń kojarzonych z aktywnością kaspaz.

1.4.12 Disiarczki

Jednym z pierwszych prostych disiarczków, który zidentyfikowano jako inhibitor papainy była cystamina.¹³⁸ Blokują ona katalityczną resztę cysteiny w centrum aktywnym. Rozbudowanie tej cząsteczki o hydrofobową resztę $P2$, co koresponduje ze specyficznością enzymu, znacznie poprawia parametry inhibicji.¹³⁹ Niemniej symetryczne disiarczki reagują bardzo wolno. Zastąpienie grupy odchodzącej w tych inhibitorach mniejszą resztą 2-pirydylową (schemat 1.10) zwiększa ich skuteczność.¹³⁹ Związki te znalazły zastosowanie w chromatografii powinowactwa, ponieważ osiągnięta z ich udziałem inaktywacja miejsca aktywnego proteazy jest procesem odwracalnym w warunkach nadmiaru tioli.^{139,140} Stosuje się je także jako titrany w oznaczaniu stężenia miejsca aktywnego w protezach cysteinowych¹⁴⁰ oraz przy identyfikacji reszt aminokwasowych miejsca aktywnego jako tzw. „sondy reaktywności”.^{140,141}

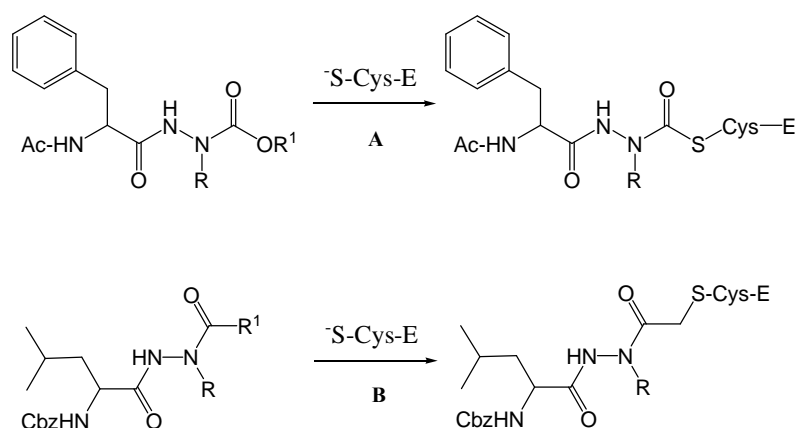


W tym ostatnim przypadku są one szczególnie użyteczne ze względu na różną charakterystykę dwóch form inhibitora wynikającą ze zmiany elektrofilowości atomu

azotu podstawnika pirydylowego w zależności od pH. W środowisku kwaśnym, w odróżnieniu od innych reagentów stosowanych do oznaczania reszt cysteinowych (np. cystaminy czy kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowego)), wiążą się selektywnie tylko z resztami miejsca aktywnego.¹⁴⁰

1.4.13 Azapeptydy

Azapeptydowe inhibitory proteaz to grupa związków, których wspólną cechą jest modyfikacja szkieletu peptydowego we fragmencie P1 polegająca na zastąpieniu w nim atomu węgla C_α atomem azotu.¹⁴² Mechanizm inhibicji w tym przypadku polega na ataku katalitycznej reszty cysteiny na ugrupowanie karbonylowe, co prowadzi do utworzenia acyloenzymu nie ulegającego hydrolizie (schemat 1.11).

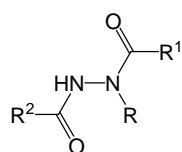


Schemat 1.11: Mechanizm inhibicji proteaz cysteinowych pochodnymi diazapeptydowymi uzależniony od rodzaju elektrofilowego ugrupowania wiążącego katalityczną resztę Cys: **A** ester, **B** halometyloketon

Jednymi z pierwszych badanych inhibitorów diazapeptydowych, aktywnych również względem proteaz serynowych, były pochodne, których C-końcową grupę karboksylową estryfikowano *p*-nitrofenolem. Ich wadą jest niestabilność w wodzie, z którą reagują tworząc oksadiazolony.⁹ Zastąpienie reszty 4-nitrofenylowej w tych związkach podstawnikiem alkiowym powoduje całkowity spadek aktywności względem enzymów serynowych.¹⁴³ Większa nukleofilowość atomu siarki katalitycznej reszty cysteiny pozwala jednak na zastosowanie trudniej odchodzącej grupy, np. reszty alkoholu alifatycznego, w analogicznych inhibitorach proteaz cysteinowych.¹⁴⁴

Otrzymane według tego wzoru azapeptydowe analogi halometyloketonów okazały się jednak inhibitorami o umiarkowanej aktywności (tabela 1.14).¹⁴⁵

Tabela 1.14. Stale szybkości drugiego rzędu inhibicji papainy estrami diazapeptydów i katepsyny B diazapeptydowymi halometyloketonami

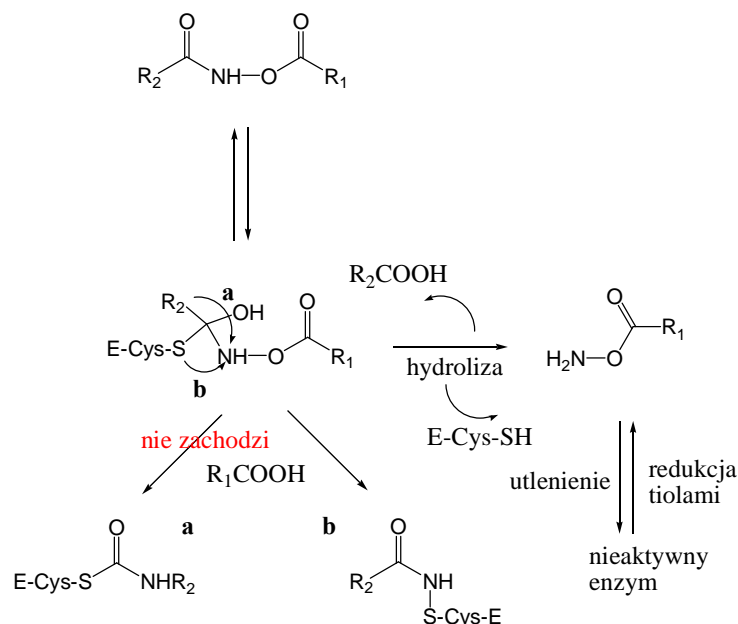


Nr	R	R ¹	R ²	Papaina k_2 [M ⁻¹ s ⁻¹]	Kat B k_2 [M ⁻¹ s ⁻¹]
111	H	OMe	Ac- <i>N</i> -Phe	13 ¹⁴⁴	
112	H	O- <i>i</i> -Bu	Ac- <i>N</i> -Phe	18 ¹⁴⁴	
113	Me	O- <i>i</i> -Bu	Ac- <i>N</i> -Phe	0,02 ¹⁴⁴	
114	H	O-Ph	Ac- <i>N</i> -Phe	11000 ¹⁴⁴	
115	H	CH ₂ Cl	Cbz- <i>N</i> -Leu		184 ¹⁴⁵
116	H	CH ₂ Br	Cbz- <i>N</i> -Leu		875 ¹⁴⁵

1.4.14 *O*-Acyloowane pochodne kwasów hydroksamowych

O-acylohydroksaminianowe pochodne peptydów były pierwotnie zaprojektowane jako inhibitory proteazy serynowej DP IV.^{146,147} Ich aktywność względem proteaz cysteinowych (tabela 1.15) okazała się jednak znacznie wyższa.^{148,149}

Mechanizm działania tych pochodnych jest złożony (schemat 1.12). Po ich reakcji z resztą katalityczną enzymu, w etapie następującym po utworzeniu przejściowego produktu tetraedrycznego, na skutek hydrolizy mogą powstawać peptyd i *O*-acylohydroksyloamina. Równolegle, w wyniku wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania 1,2-anionotropowego, powstaje trwały produkt przyłączenia fragmentu inhibitora do enzymu.³⁷ Dyskutowano dwa alternatywne warianty tego etapu. Jeśli w pierwszej fazie przegrupowania odchodzi reszta peptydowa, tworzy się tiokarbaminian. Natomiast, jeśli grupą odchodzącą jest reszta Cys enzymu, powstaje sulfenamid.⁹ Druga możliwość została potwierdzona wynikami eksperymentów, w których wykorzystano spektroskopię NMR.¹⁵⁰ Jeżeli zrezygnuje się z rutynowo używanych w badaniach nad inhibicją proteaz cysteinowych odczynników redukujących, acylohydroksamiany są hydrolizowane i inaktywacja enzymu następuje wskutek utlenienia katalitycznej reszty cysteiny powstającą acylohydroksyloaminą. Ta reakcja jest odwracalna w obecności tioli. W środowisku redukującym można obserwować cykl przemian: hydroliza – utlenienie – redukcja, a inhibicja będzie skutkiem wyłącznie tworzenia sulfenamidu w równoległym procesie towarzyszącym temu cyklowi.¹⁵⁰



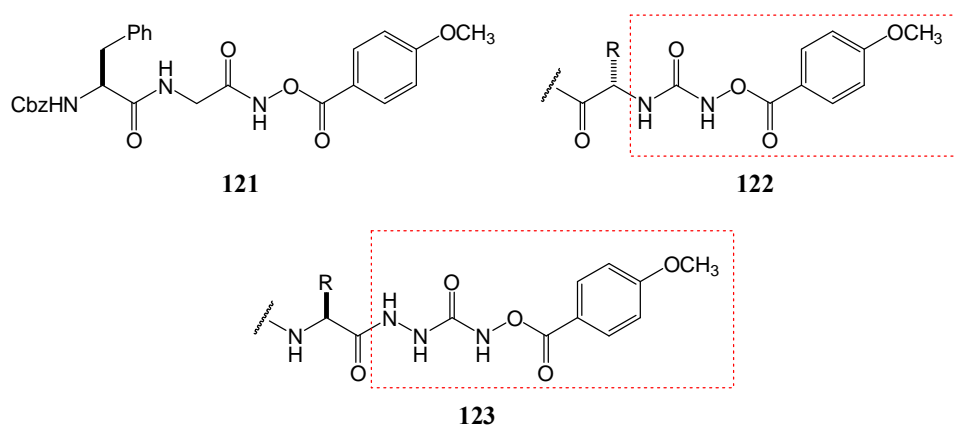
Schemat 1.12: Mechanizm inhibicji proteaz cysteinowych *O*-acylowanymi pochodnymi kwasów hydroksamowych

Tabela 1.15: Aktywność *O*-acylowanych pochodnych kwasów hydroksamowych wyrażona za pomocą stałych szybkości inhibicji proteaz cysteinowych i serynowych

Wzór inhibitora	Enzym	k_2 [$M^{-1}S^{-1}$]	Wzór inhibitora	enzym	k_2 [$M^{-1}S^{-1}$]
117 Z-Phe-Ala-NHO-Mes	katepsyna B	640000 ¹⁴	119 Z-Phe-Phe-NHO-Ma	katepsyna S	21000 ³⁴⁴
117 Z-Phe-Gly-NHO-Mes	katepsyna B	580000 ³⁴⁵	119 Z-Phe-Phe-NHO-Ma	katepsyna L	1222000 ³⁴⁴
118 Boc-Gly-Phe-NHO-Bz	termitaza	652 ³⁴⁸	120 Boc-Ala-Ala-NHO-Nbz	elastaza	12 ³⁴⁸
118 Boc-Gly-Phe-NHO-Bz	subtylizyna	1020 ³⁴⁸	121 Ala-Pro-NHO-Nbz	DP IV	1,9 ³⁴³

Zaprojektowanie skutecznego inhibitora mającego potencjalnie pełnić rolę leku w pierwszej kolejności wymaga precyzyjnego zdefiniowania celu, do którego ma być skierowany i określenia jego fizjologicznej funkcji. Bardzo cennymi narzędziami wykorzystywanymi do przeprowadzenia takiego „rozpoznania” są wysoce selektywne inhibitory zawierające w strukturze fragmenty pozwalające na ich łatwą lokalizację dostępnymi metodami detekcji po wprowadzeniu do ustroju, co umożliwia wskazanie miejsca działania oraz funkcję określonego enzymu. Jest to szczególnie pomocne w badaniu złożonych układów enzymatycznych typu proteasomu. *O*-Acylohydroksaminiany stanowią klasę związków idealnie nadających się do badania fizjologicznej roli proteaz cysteinowych. Są one zdecydowanie mniej toksyczne, stabilniejsze i o wiele bardziej selektywne od halometrykonów czy aldehydów. Dodatkowym atutem jest prostota ich otrzymywania, co odróżnia je od innych

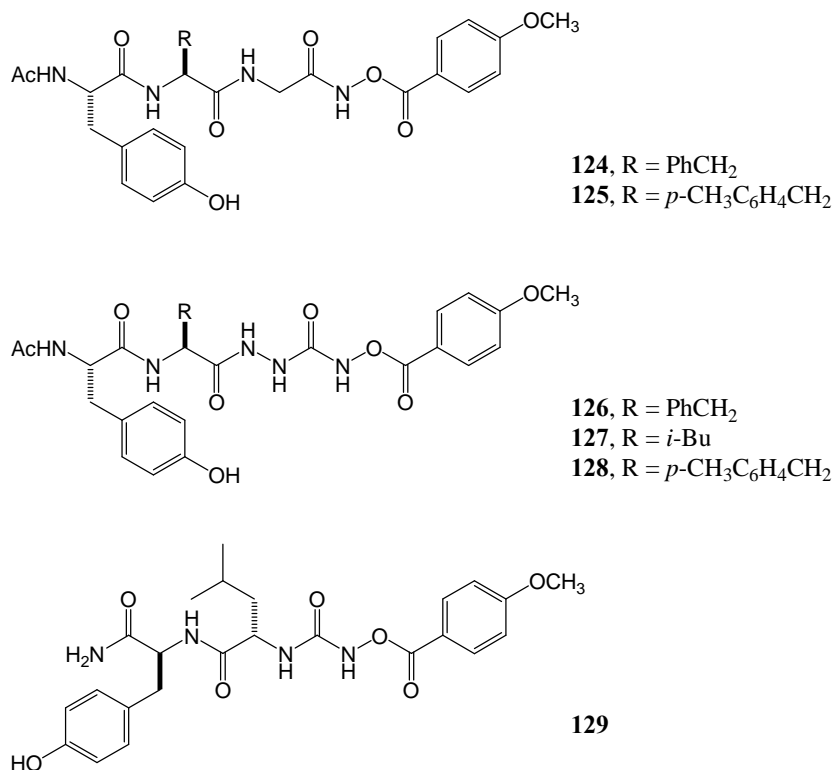
pochodnych stosowanych jako sondy znakujące działające w oparciu o mechanizm inhibicji. Reakcje wykorzystywane w ich syntezie z powodzeniem mogą być prowadzone na stałym podłożu technikami stosowanymi w syntezie peptydów. Ułatwia to automatyzację procesu, a także pozwala na względnie łatwe wprowadzanie do struktury cząsteczki odpowiednio zoptymalizowanych reszt spełniających kryterium sterycznego dopasowania do wnęk wiążących enzymu. Serię takich pochodnych otrzymano opierając się na strukturze związku **121**,¹⁵¹ inhibitorze katepsyn rysunek 1.12). Na jego bazie powstał najpierw peptyd z przyłączoną do *N*-końca resztą *O*-acylohydroksymocznika (**122**).¹⁵²



Rysunek 1.12: Różny sposób przyłączenia reszt końcowych w inhibitorach *O*-acylohydroksaminianowych

Fragment ten jest mimetykiem reszty epoksybursztynianu. Umieszczenie go na *N*-końcu cząsteczki uniemożliwia dołączenie podstwanika P1. Powoduje to zawężenie grupy docelowych enzymów z klanu CD, a także ogranicza możliwości modyfikacji cząsteczki pod kątem poprawy selektywności. Problem ten rozwiązano syntezując pochodne azapeptydowe, w których reaktywna reszta acylohydroksaminianowa znajduje się na *C*-końcu cząsteczki (**123**). Pochodne z *N*-końcowym fragmentem acylohydroksymocznika były łatwo otrzymywane na drodze klasycznej syntezy peptydów na stałym podłożu i okazały się dobrymi inhibitorami katepsyn. Niemniej, z powodu różnic w reaktywności przedstawionych typów acylohydroksaminianów **121-123** (tabela 1.16), a także stabilności kowalencyjnego kompleksu ligand-enzym, tylko nowe inhibitory z fragmentem azaglicylo-*O*-acylohydroksaminianowym spełniły wymagania stawiane sondom znakującym w oparciu o mechanizm inhibicji. Związek

123 był aktywniejszy od swojego prekursora **121**, zarówno względem katepsyny B, jak i L.



Rysunek 1.13: Trzy typy inhibitorów *O*-acylohydroksaminianowych

Tabela 1.16: Porównanie aktywności i selektywności 3 typów pochodnych *O*-acylowanych kwasów hydroksamowych 121, 123 i 132

Nr	Katepsyna B k_{ass} [M ⁻¹ s ⁻¹]	Katepsyna L k_{ass} [M ⁻¹ s ⁻¹]
121	6 000	7 400
123	75 000	65 000
132	1 400	43 000

Chcąc ocenić skuteczność przedstawionych typów inhibitorów w warunkach zbliżonych do fizjologicznych testowano ich aktywność względem homogenatu z wątroby szczura (struktury **124-129**, rysunek 1.13). Okazało się, że najbardziej aktywny względem katepsyn objętych testem jest związek **126**, dziesięciokrotnie bardziej skuteczny od swojego prekursora **124** (tabela 1.17). Pochodna **129** hamowała katepsyny z homogenatu podobnie jak związek **124**. Pochodna **126** wykazywała również pięciokrotnie wyższą selektywność względem katepsyny B w relacji do wyjściowego związku **124**. Umiarkowaną selektywność względem katepsyny Z zaobserwowano w przypadku inhibitora **129**, w którym *N*-końcowy *p*-acyloanizol

włączono do cząsteczki poprzez resztę mocznika. Zróżnicowaną selektywność tłumaczy się odmienną reaktywnością trzech zaprezentowanych typów fragmentów uczestniczących w reakcji z katalityczną resztą cysteiny, a także dopasowaniem reszt P2 do wnęki S2 katepsyn.

Tabela 1.17 Aktywność i selektywność trzech typów pochodnych *O*-acylowanych kwasów hydroksamowych względem katepsyn z homogenatu wątroby szczurzej

Nr	IC_{50} [μ M]				Współczynnik selektywności
	Katepsyna Z	Katepsyna B	katepsyna H	Katepsyan J/C	
124	1,1	0,47	>5	>5	2,3*
126	0,17	0,013	0,45	0,95	13*
129	0,13	0,33	>5	>5	2,5**

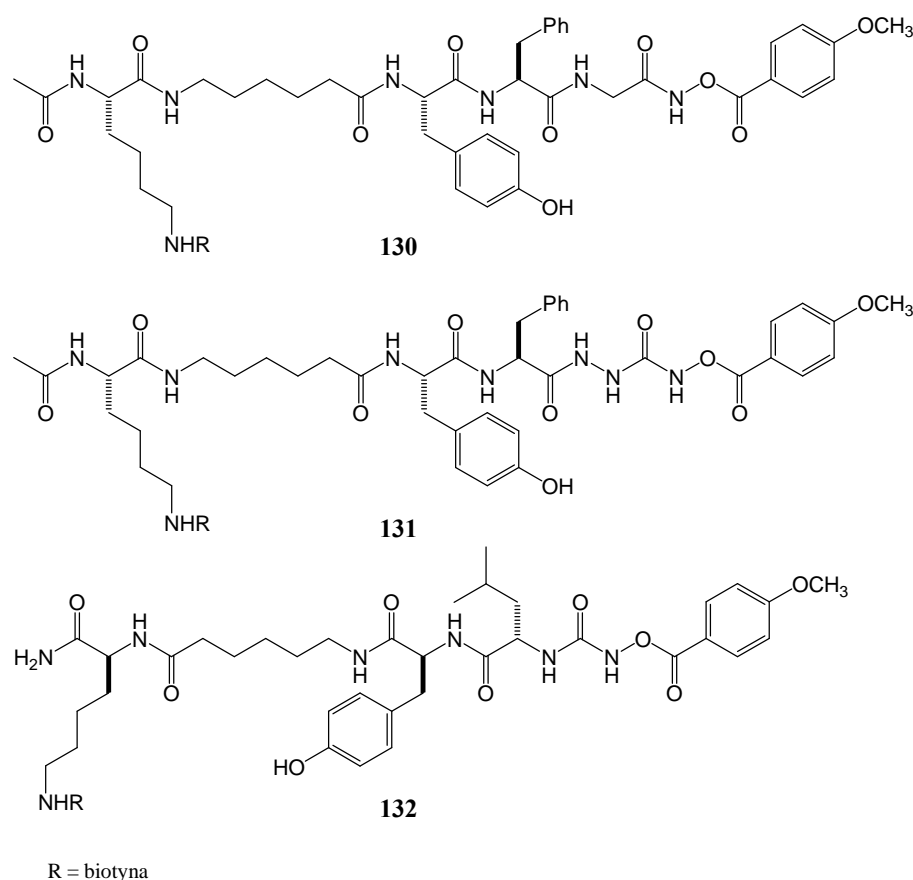
* współczynnik selektywności wyrażony jako IC_{50} dla katepsyny Z/ IC_{50} dla katepsyny B, ** wsp. sel. wyrażony jako IC_{50} dla katepsyny B/ IC_{50} dla katepsyny Z

Użyteczność opisanych pochodnych w roli struktur wiodących przy poszukiwaniu nowych inhibitorów czynników chorobotwórczych potwierdzono projektując ich analogii jako specyficzne inaktywatory falcypainy 1 z *Plazmodium falciparum* wywołującego malarię. Związek **127** powstał jako analog pochodnej **126** z resztą leucyny w pozycji P2, o której wiadomo było z wcześniejszych doniesień,⁵ że jest preferowana przez wnękę S2 znanych falcypain. W inhibitorach **125**, **128** i **129** pozycję P2 zajmuje reszta 4-metylofenyloalaniny, która indukuje selektywność względem falcypainy 1.⁵ W tabeli 1.18 porównano aktywność i selektywność potencjalnych inhibitorów przeciwmalarycznych. Warto zauważyć, że pochodna z resztą leucyny w P2, wykazuje 22 razy gorszą selektywność od związku **128**, zawierającego w P2 resztę 4-metylofenyloalaniny mającą w założeniach indukować selektywność względem falcypainy 1.

Tabela 1.18: Porównanie aktywności i selektywności wybranych inhibitorów o właściwościach przeciwmalarycznych

Nr	IC_{50} [μ M]		Współczynnik selektywności
	Falcypaina 1	Falcypaina 2/3	
124	0,33	0,43	1,3
127	0,094	0,068	0,7
128	0,073	1,6	22
129	0,64	1,0	16

Fakt kowalencyjnego wiązania związków **125-129** przez centrum aktywne katepsyn wykorzystano opracowując nowe sondy aktywności enzymatycznej działające w oparciu o mechanizm inhibicji. Początkowo próbowano znakować resztę tyrozyny w cząsteczkach inhibitorów radioaktywnym jodem. Próby te zakończyły się niepowodzeniem z powodu nietrwałości cząsteczek w warunkach jodowania. Pozytywne rezultaty przyniosło włączenie do struktury inhibitorów N_ϵ -biotynylowanej lizyny poprzez dodatkowy fragment heksyloaminowy (**130-132**, rysunek 1.14). Przeprowadzone znakowanie katepsyn L i B otrzymanymi sondami dało pozytywny efekt tylko w przypadku biotynyloowanych pochodnych aza-glicylo-*O*-acylohydroksaminianowych, kwalifikując je jako „interesujące narzędzia” w proteomice. Pochodne zawierające łącznik mocznikowy dawały w reakcji z enzymem stosunkowo nietrwały produkt, co dyskwalifikowało je jako sondy aktywności enzymatycznej w badaniach nad fizjologiczną funkcją katepsyn.

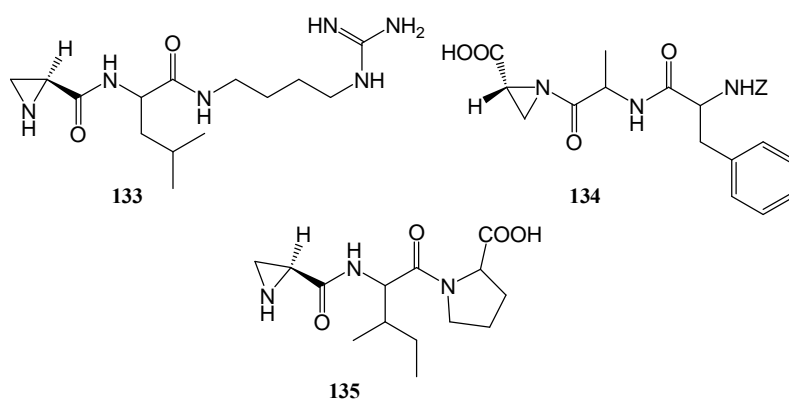


Rysunek 1.14: Biotynylowane pochodne stosowane jako substancje znakujące ze względu na powinowactwo do enzymu

1.4.15 Azirydyny i tiirany

Do zainteresowania tiiranami i azirydynami jako potencjalnymi inhibitorami proteaz cysteinowych przyczynił się między innymi eksperyment, w którym wyznaczono stałą drugiego rzędu szybkości wiązania się kwasu (*S*)-azirydno-2-karboksylowego do centrum aktywnego papainy ($k_2 = 17 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).¹²⁹ Zachęcające były również wyniki badań nad inhibicją proteaz serynowych związkami azirydno-2-karboksylowymi oraz azirydno-2,3-dikarboksylowymi. Okazało się, że związki tego typu są substratami, a nie inhibitorami proteaz serynowych i esteraz.^{153,154} Gwarantowało to selektywność projektowanych na ich bazie inhibitorów proteaz cysteinowych. Dodatkowym atutem tych związków jest trójkowalencyjny atom azotu pierścienia azirydynowego, który umożliwia racjonalne modyfikowanie tego fragmentu podstawnikami wpływającymi na potencjalną reaktywność i selektywność syntezowanych ligandów. Te przesłanki zadecydowały o kontynuacji badań.

Próby przyłączenia reszty azirydno-2-karboksylowej do łańcucha peptydowego, zarówno po stronie P jak i P', przebiegły pomyślnie (struktury **133-135**, rysunek 1.15).¹⁵⁵ Niepowodzeniem zakończyły się natomiast pierwsze próby usunięcia grup ochronnych zastosowanych przy syntezie tych pochodnych, ponieważ po odblokowaniu okazały się one niestabilne.¹⁵⁵ Pozytywne wyniki uzyskano po raz pierwszy dla pochodnej **134**. Wyznaczona dla niej wartość stałej szybkości k_2 inhibicji papainy wynosiła $262 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.



Rysunek 1.15: Azirydnowe pochodne znanych inhibitorów epoksydowych

Pierścień azirydynowy jest analogiczny do epoksydowego i wykazuje podobną reaktywność wobec nukleofili. Fakt ten wykorzystano opracowując azirydynowe analogi znanych inhibitorów epoksydowych, na przykład **67**. Testy enzymatyczne z ich udziałem pokazały istotną zależność aktywności od pH, z maksimum przy wartości 4. Przy takim pH wykazują one aktywność tego rzędu, co ich epoksydowe analogi.¹⁵⁶ Ważne jest, że w przypadku azirydyn skuteczniejsze okazały się diastereoizomery z konfiguracją (R,R) atomów węgla pierścienia. Porównanie aktywności epoksydu **67** i jego azirydynowego analogu **135** względem katepsyny B wypadło na niekorzyść **135** ($13 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Tą obserwację tłumaczy się obecnością protonu na atomie azotu w pochodnej **135**, która powoduje zmianę sposobu wiązania inhibitora w centrum aktywnym enzymu.¹⁵⁶ Próba acylowania atomu azotu resztami aminokwasów doprowadziła do otrzymania mniej aktywnych pochodnych.⁹

1.4.16 [1,2,4]-tiadiazole

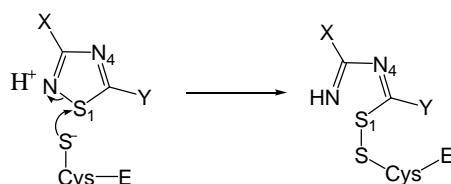
Poszukiwanie skutecznych inhibitorów katepsyny B, celu badawczego ważnego przede wszystkim ze względu na jej udział w patogenezie wielu chorób (choroby neurodegeneracyjne,¹⁵⁴ artretyzm, nowotwory,¹⁵⁸⁻¹⁶⁴ doprowadziły do zaprojektowania bardzo interesującej elektrofilowej grupy wiążącej się nieodwracalnie z katalityczną resztą Cys w katepsynie B.

Do zablokowania docelowego enzymu pochodnymi [1,2,4]-tiadiazolowymi dochodzi na skutek tworzenia się disiarczkowego produktu: enzym-Cys-S-S-inhibitor. Powstaje on w wyniku ataku atomu siarki łańcucha bocznego Cys na atom siarki heterocyklicznego pierścienia inhibitora. Formowaniu mostka disiarczkowego towarzyszy otwarcie pierścienia tiadiazolowego¹⁶⁵ (schemat 1.13).

Podstawniki oznaczone na schemacie „X” znacząco wpływają na powinowactwo inhibitora do enzymu. K_i rośnie w szeregu $\text{OMe} < \text{Ph} < \text{COOH}$. Natomiast reszty „Y” pełnią funkcję fragmentu rozpoznawanego przez enzym i decydują o selektywności. Najaktywniejszy inhibitor (**136**, X = OMe, Y = Leu-Pro-OH, tabela 1.19) hamował katepsynę B ze stałą szybkości drugiego rzędu $k_i/K_i = 5630 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, co było wynikiem 100 razy korzystniejszym w stosunku do uzyskanego dla papainy ($k_i/K_i = 49 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Selektywność potwierdzono także w badaniach z udziałem katepsyny S, która nie ulegała inhibicji przy wartości stężenia inhibitora do 200 μM . Katepsyna H ulegała odwracalnej inhibicji z $IC_{50} = 200 \mu\text{M}$. Estryfikacja grupy karboksylowej części

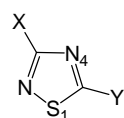
peptydowej inhibitora resztą metylową (**139**) prowadziła do obniżenia jego aktywności prawie 1800 razy w stosunku do pochodnej kwasowej ($k_i/K_i = 3,15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Wydłużenie dipeptydowego fragmentu Y Leu-Pro-OH do tripeptydu Gly-Leu-Pro-OH prowadziło do znacznego obniżenia aktywności ligandów ($k_i/K_i = 1,52 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Podobnie modyfikacja Leu-Pro-OH do $\text{NH}_2\text{CO-Leu-Pro-OH}$ wpływała na zmniejszenie szybkości wiązania ($k_i/K_i = 36 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Bardziej zaawansowane badania patofizjologiczne *in vitro* nad wpływem inhibitora (**136**) na degradację proteoglikanu w chrząstce stawowej pobranej ze zdrowych stawów indukowaną interleukiną-1 (IL-1) i przebiegającą z udziałem katepsyny B wykazały zahamowanie procesu degeneracyjnego w 60% przy stężeniu 50 ng/mL IL-1 i 1 μM stężeniu inhibitora **136**.¹⁶⁶



Schemat 1.13: Mechanizm inhibicji proteaz cysteinowych pochodnymi diazotiazolowymi

Tabela 1.19: Aktywność inhibitorów zawierających w strukturze pierścień 1,2,4-tiadiazolu względem wybranych proteaz cysteinowych



136-143

nr	X	Y	Katepsyna B			Katepsyna S	Katepsyna H	Papaina
			K_i [μM]	k_i/K_i [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_i [s^{-1}]	IC_{50} [μM]	IC_{50} [μM]	IC_{50} [μM]
136	MeO	Leu-Pro-OH	2,6	5630	0,015	BI	200	
137	Ph	Leu-Pro-OH	74	175	0,013	BI	BI	120
138	COOH	Leu-Pro-OH	300	293	0,089			
139	MeO	Leu-Pro-OMe		3,15				
140	MeO	Gly-Leu-Pro-OH		1,52				
141	MeO	NHCO-Leu-Pro-OH	390	36	0,014	BI	BI	BI
142	MeO	NHCO-Leu- <i>i</i> -amyl	367	84	0,032			
143	MeO	Cbz-Phe-Ala-	37	864	0,032	50	50	142

K_i , stała dysocjacji niekowalencyjnego kompleksu enzym-inhibitor; k_i , stała szybkości przemiany niekowalencyjnego kompleksu EI w kowalencyjny addukt; BI, brak inhibicji; IC_{50} , mierzono przy 10 μM stężeniu substratu

1.5 Charakterystyka gingipain

1.5.1 Pochodzenie gingipain oraz ich rola w patogenezie i przebiegu paradontozy*

Porphyromonas gingivalis, Gram-ujemna beztlenowa bakteria, pozyskująca składniki pokarmowe na drodze proteolizy białek kolonizowanego organizmu, została uznana za podstawowy czynnik etiologiczny odpowiedzialny za powstawanie i rozwój paradontozy u osób dorosłych. Jej morfologia jak i szeroka gama czynników wewnętrznych o zdefiniowanej roli w kolonizacji kieszonek dziąsłowych umożliwiają patogenowi łatwą adaptację w środowisku jamy ustnej i stosunkowo swobodny rozwój przy zahamowanej odpowiedzi immunologicznej gospodarza.¹⁶⁷ Wśród tych czynników najmocniej zaznaczona jest rola tzw. czynników przylegania (adhezyny, fimbrie), hemaglutynin oraz enzymów proteolitycznych. Wśród kilku typów proteaz ekspresjonowanych przez *Porphyromonas gingivalis* swoją specyficznością i aktywnością wyróżniają się enzymy nazwane gingipainami.

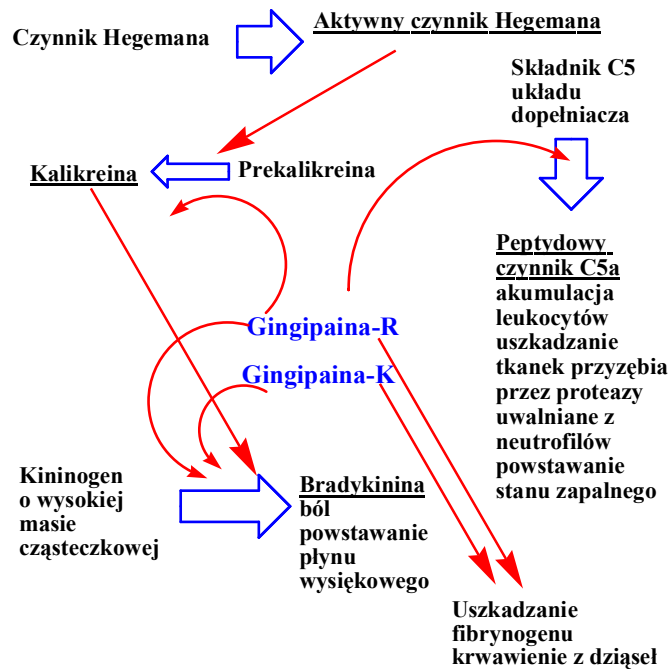
Porównanie struktury pierwszorzędowej gingipain ze strukturami innych białek, w tym enzymów proteolitycznych, zdeponowanych w różnych bazach danych, dowodzi ich unikalnego charakteru. Zadecydowało to o zaszeregowaniu ich do oddzielnej rodziny proteaz cysteinowych.¹⁶⁸ Mimo braku znaczącego podobieństwa z innymi proteazami na poziomie sekwencji aminokwasów, gingipainy wykazują wyraźne analogie w topologii domeny katalitycznej gingipainy argininowej (RgpB, gingipaina R2) i domen obecnych w kaspazach¹⁶⁹ (rodzina C14), enzymach uczestniczących w apoptozie i dezaktywacji cytokin.¹⁷⁰ Fakt ten pozwala zakładać istnienie wspólnego przodka w przebiegu ewolucji obu rodzin białek. Warto wspomnieć również o powielaniu motywu strukturalnego His-Gly-łącznik-Ala-Cys w obrębie wnęki katalitycznej gingipain, kaspaz, bakteryjnej klostopainy (rodzina 11), separazy – białka uczestniczącego w rozdzielaniu chromatyd siostrzanych podczas anafazy (rodzina 50)¹⁷¹ oraz leguminyzy - przedstawicieli rodziny 13 uczestniczących w modyfikacjach posttranslacyjnych,¹⁷² co wskazuje na podobny mechanizm katalizowanych przez

* Tekst tego podrozdziału powstał w oparciu o fragment pracy magisterskiej²⁵⁴ autora niniejszej dysertacji i zawiera autocytywania. Przy czym, został on w znacznym stopniu zmodyfikowany, uzupełniony o nowe dane i wzbogacony o dodatkowe komentarze i schematy.

te enzymy reakcji. Wspólną cechą wszystkich tych enzymów jest także specyficzność substratowa określana przez budowę kieszeni wiążącej S1, która ściśle definiuje strukturę reszty P1 liganda. Są to odpowiednio reszta Asp dla leguminaz, Lys dla gingipainy K, Arg dla gingipainy R, klostropain i separazy oraz Asp dla kaspaz. Przedstawiciele pięciu wspomnianych rodzin proteaz wykazują ponadto analogiczne sfałdowanie typu „caspase-hemoglobinase”,¹⁷³ w ten sposób będąc enzymami ewolucyjnie spokrewnionymi z peptydazami cysteinowymi klanu CD.

Jak wspomniano wyżej, budowa gingipain wymusza ich określone preferencje substratowe. Przede wszystkim charakter wnęk S1 gingipain R – argininowych (RgpB i RgpA) oraz gingipainy K - lizynowej (Kgp) wpływa na wysoką specyficzność ukierunkowaną na substraty zawierające w łańcuchu peptydowym sekwencję Arg-Xaa (Rgp) lub Lys-Xaa (Kgp).¹⁷⁴ Dzięki przystosowaniu wnęki S1 w Rgp do wiązania łańcucha bocznego Arg, położonemu blisko powierzchni, łatwo dostępnemu miejscu wiążącemu enzymu oraz przewadze w miejscu aktywnym reszt zawierających ujemnie naładowane łańcuchy boczne, gingipainy osiągają nie tylko specyficzność względem określonej sekwencji aminokwasów, ale także możliwość wiązania substratów o różnej długości łańcucha peptydowego.¹⁷⁵ Sprawia to, że enzymy te są świetnie przystosowane jako narzędzia pozyskiwania przez *P. gingivalis* składników odżywczych z różnorodnych źródeł, w tym białek surowicy, składników macierzy zewnątrzkomórkowej, cytokin i ich receptorów, a także wielu innych białek powierzchniowych komórek gospodarza.¹⁷⁶ Spektrum aktywności proteolitycznej gingipain jest rezultatem bardzo efektywnego „ewolucyjnego kompromisu” między ergonomią metabolizmu całej komórki patogena a określoną funkcjonalnością ekspresjonowanych w niej białek i jednocześnie przykładem doskonałego przystosowania do roli pasożyta. Okazuje się, że jeden enzym obok wydawałoby się mało ukierunkowanej roli, jaką jest degradacja różnych peptydowych składników komórki gospodarza w celu dostarczenia patogenowi węgla,¹⁷⁴ wskazującej na pozornie małą specyficzność enzymu, pełni jednocześnie bardzo specjalistyczne funkcje. Można tu wymienić udział w przebiegu infekcji tkanek przyzębia, w tym zaburzenie mechanizmów obronnych gospodarza poprzez naśladowanie zaangażowanych w nie wysoce wyspecjalizowanych białek regulatorowych. Szczególnie podkreśla się ich rolę w zaburzaniu krzepnięcia,^{177,178} kaskady układu dopełniacza¹⁷⁹ oraz

kaskadowego procesu tworzenia kalikreiny – czynnika uwalniającego bradykininę z kininogenu (schemat 1.14).¹⁷⁷



Schemat 1.14: Rola gingipain R i K w zaburzeniu procesu krzepnięcia, układu dopełniacza oraz kaskady prowadzącej do uwalniania bradykininy w przebiegu parodontozy

Zidentyfikowano dwie formy gingipainy R: sekrecyjną i związaną z błoną. Obie biorą czynny udział w zwiększaniu przepuszczalności naczyń poprzez indukowanie produkcji kalikreiny, a w konsekwencji uwalnianie bradykininy,¹⁸⁰ polipeptydu rozszerzającego naczynia, który wywołuje miejscowe przekrwienia. Potraktowanie próbki surowego ekstraktu bakteryjnego *P. gingivalis* przeciwciałami skierowanymi przeciwko gingipainie R praktycznie znosi efekt zwiększonej przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych (ang. **Vascular Permeability Enhancement**) u zwierząt laboratoryjnych obserwowany w przypadku podziałania ekstraktem, w którym aktywność RgpB nie została zahamowana.¹⁸¹ Obserwacja ta potwierdza podstawowe znaczenie gingipainy R w omawianym procesie. Jednocześnie sugeruje, że gingipaina K nie odgrywa w nim istotnej roli.¹⁷⁷ W rzeczywistości oba enzymy są odpowiedzialne za VPE, ale zablokowanie gingipainy R, która katalizuje aktywację prekalikreiny we wcześniejszym etapie kaskady prowadzącej do uwalniania bradykininy, skutecznie blokuje przejście: kininogen o wysokiej masie cząsteczkowej – bradykinina, nawet w obecności Kgp. Bowiem pokazane na schemacie bezpośrednie przekształcenie kininogenu w bradykininę bez udziału kalikreiny wymaga kooperacji obu gingipain

R i K. Podstawowym skutkiem omówionego zjawiska jest gromadzenie się płynu w powstających szczelinach dziąsłowych, który stanowi idealne dla rozwoju, bogate w składniki odżywcze środowisko bytowania *P. gingivalis*.¹⁸⁰

Gingipaina R okazała się enzymem wydajnie katalizującym przejście składnika C5 układu dopełniacza w formę C5a, która jest czynnikiem chemotaktycznym dla neutrofilów. W istocie obserwuje się znaczącą infiltrację tych ciałek do chorobowo zmienionych tkanek skolonizowanych przez *P. gingivalis*. Ponadto potwierdzono zdolność gingipainy R do degradacji składnika C3 układu dopełniacza, a tym samym do blokowania opsonizacji odbywającej się z udziałem fragmentów C3. Upośledzona opsonizacja wiąże się z zahamowaniem fagocytozy – jednego z podstawowych składników odpowiedzi immunologicznej organizmu.¹⁸⁰ Podane fakty tłumaczą znaczącą akumulację neutrofilów w obrębie chorobowo zmienionych tkanek dziąseł, a w związku z tym także wysoką koncentrację uwalnianych przez nie proteaz. Zwiększenie stężenia enzymów uszkodzających tkanki i w efekcie nasilenie proteolizy dostarcza bakteriom dodatkowych składników odżywczych w postaci niskocząsteczkowych peptydów i aminokwasów.

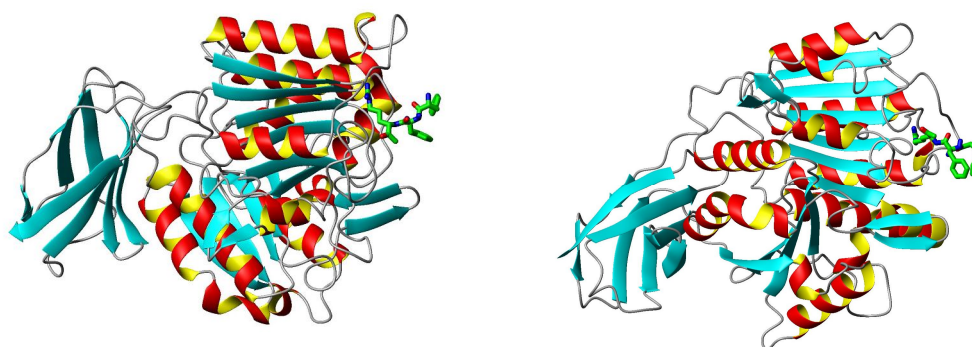
Gingipaina K wykazuje dużo bardziej zawężoną specyficzność w porównaniu do gingipain R. Nie umniejsza to jednak w niczym roli, jaką odgrywa w zasiedlaniu nowego terytorium przez patogena, a także jego rozwoju i podtrzymaniu istotnych funkcji życiowych. Enzym ten został sklasyfikowany nawet jako istotniejszy czynnik zjadliwości *P. gingivalis*.¹⁷⁴ Jednym z ważniejszych zadań tej proteazy jest udział w mechanizmie przyswajania hemu i żelaza przez bakterię. Z jej udziałem możliwe jest posttranslacyjne przekształcenie różnych izoform gingipain prowadzące do pełnej funkcjonalności domen wiążących hemoglobinę. Ze względu na bardzo wysoką specyficzność enzymu, niewiele białek gospodarza wykazuje wysokie powinowactwo do jego miejsca aktywnego. Jednym z substratów tej proteazy jest fibrynogen. W warunkach *in vitro*, w stężeniach nanomolarnych rozcina ona łańcuch A α fibrynogenu uniemożliwiając mu polimeryzowanie w postaci włókien fibrynowych.¹⁸² Degradacja fibrynogenu w surowicy wydłuża czas trombinowy i przyczynia się do zahamowania tworzenia skrzepu. Efekt ten dodatkowo wzmacniany jest przez degradację prokoagulacyjnego fragmentu wysokocząsteczkowego kininogenu.¹⁸³ Procesy te wpływają na kliniczny przebieg paradontozy decydując o wystąpieniu charakterystycznego objawu, jakim jest nadmierna tendencja do krwawienia z dziąseł. Dodatkowo Kgp degraduje hemoglobinę oraz inne białka zawierające podobną grupę

prostetyczną wiążącą żelazo.^{184,185} Ta własność może być kluczowa dla uwalniania z białek gospodarza hemu – jednego z podstawowych składników odżywczych bakterii.

Nie tylko własności proteolityczne gingipain gwarantują patogenowi skuteczną kolonizację nowego siedliska. RgpA (gingipaina R1) oraz Kgp uczestniczą w adhezji komórek bakterii do tkanek gospodarza wykorzystując domenę hemaglutynacyjną (HA2), określaną również mianem receptora hemoglobiny. Badania nad powinowactwem gingipain do szeregu białek ujawniły ich szczególną skłonność do wiązania się z fibronektyną, lamininami i fibrynogenem poprzez tą domenę. Związane białka są następnie degradowane przez katalityczne domeny gingipain.¹⁸⁰ Zgodnie z tym mechanizmem przebiega prawdopodobnie również uwalnianie hemu z hemoglobiny erytrocytów.¹⁷⁴ Często obserwowana obecność kompleksów gingipaina – specyficzne białko na powierzchni błon i pęcherzyków wskazywać może na istotną rolę tych enzymów w przyleganiu bakterii do powierzchni komórkowych gospodarza.

1.5.2 Ogólny plan budowy RgpB

Cząsteczka gingipainy R kształtem przypomina ząb, w którym można wyróżnić prawie sferyczną część górną o średnicy 45 Å i zakrzywiony „korzeń” o długości 40 Å. Część górna zbudowana jest z 351 reszt aminokwasowych i stanowi domenę katalityczną. Wydłużona część dolna jest złożona z 84 reszt i budową przypomina charakterystyczną domenę nadrodziny immunoglobulin (IgSF).¹⁶⁹

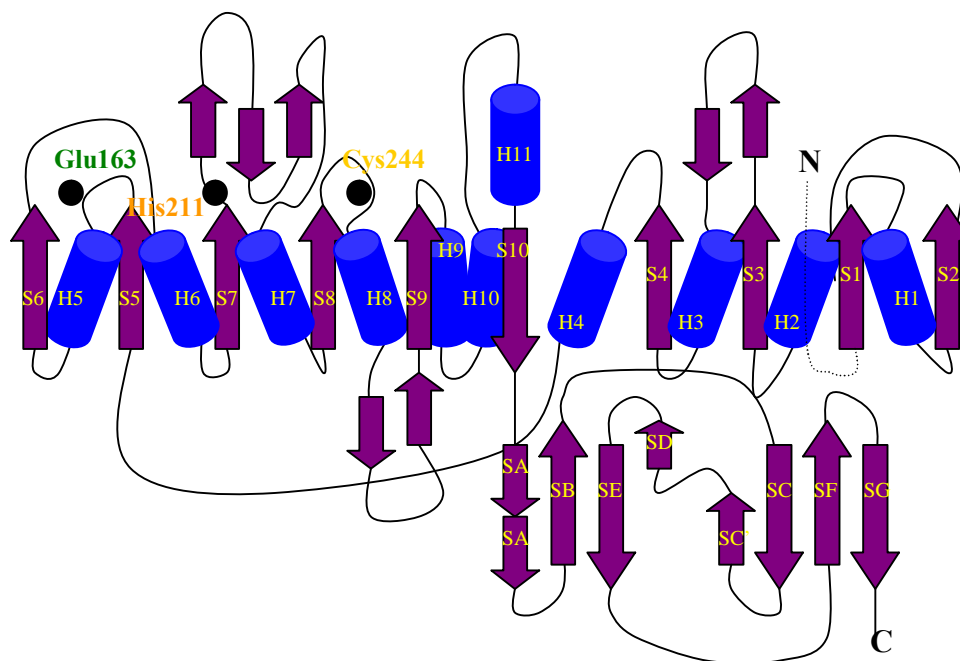


Rysunek 1.16: Model wstępny struktury RgpB w dwóch rzutach uwzględniający lokalizację charakterystycznych elementów struktury drugorzędowej tego białka (α -helis i β -harmonijek – opis w tekście), położenie centrum katalitycznego, sposób wiązania inhibitora D-Phe-L-Phe-L-Arg-CH₂Cl we wnękach wiążących enzymu, z zaznaczeniem przestrzennego ułożenia łańcucha bocznego reszty argininowej inhibitora. Model ilustruje także ogólny plan budowy proteazy – widoczne są: „korzeń zęba” – domena immunoglobulinowa (po lewej stronie) oraz „korona” – zawierająca centrum aktywne (prawe strony w obu rzutach).

RgpB cechuje wysoki udział typowych drugorzędowych motywów strukturalnych. W części katalitycznej występują zarówno motywy strukturalne typu α jak i β . Domena IgSF z kolei zbudowana jest tylko z łańcuchów o konformacji β . Siedem spośród reszt cysteinowych w RgpB jest niesparowanych, przy czym łańcuchy boczne trzech z nich (Cys185, katalitycznej reszty Cys244 oraz Cys299) nie są wyeksponowane. RgpB wykazuje niski punkt izoelektryczny i względnie wysoki udział reszt naładowanych o nieskompensowanym ładunku.

1.5.3 Budowa domeny katalitycznej enzymu

Domena katalityczna RgpB zbudowana jest z dwóch mniejszych domen - A i B. Każda z nich składa się centralnego fragmentu o konformacji β , kilku łącznikowych struktur typu spinki do włosów oraz helis osłaniających z dwóch stron nici budujące fragment centralny (rysunek 1.17).¹⁶⁹



Rysunek 1.17: Drugorzędowa struktura RgpB; Na rysunku α -helisy przedstawiono jako walce, struktury β zaznaczono strzałkami blokowymi, elementy łącznikowe zobrazowano liniami ciągłymi, literami C, N oznaczono aminowy i karboksylowy koniec głównego łańcucha peptydowego, a czarnymi kółkami wskazano orientacyjne położenie reszt katalitycznych. Ponadto, struktury β opisano wielką literą S z odpowiednim numerem, a helisy oznaczono literą H, także zachowując numerację użytą w tekście.

Fragment o konformacji β domeny A tworzą 4 przebiegające równoległe nici układające się w przecinających się płaszczyznach, odchylających się od siebie o stały kąt, w taki sposób, że położenie dwóch najbardziej zewnętrznych różni się o 45° . Oslaniające ten fragment helisy przebiegają prawie równoległe względem siebie, ale antyrównoległe do nici struktury β -kartki. Rdzeń enzymu ma charakter hydrofobowy, przy czym obecne są w nim reszty aminokwasowe tworzące mostki solne: Arg112-Asp93 i Arg34-Glu132-Lys31.

Domeny tworzące domenę katalityczną połączone są położonym przy powierzchni enzymu segmentem spinającym helisę 4 domeny A z nicią 5 domeny B. Środkową część domeny B zajmuje struktura β -kartki złożona z sześciu nici. Pięć pierwszych nici tej struktury przebiega równoległe i leży praktycznie w jednej płaszczyźnie. Szósta jest antyrównoległa względem pozostałych i krzyżuje się z nicią 4 stanowiącą krawędź domeny A, tworząc wiązania wodorowe między Phe339 i Arg112. Centralny fragment domeny β jest osłaniany przez siedem helis H5-H11, które poza H10 przebiegają równoległe względem siebie i antyrównoległe do nici struktury β . Należy zwrócić uwagę na wyjątkowy charakter helisy H9. Jej *N*-końcowy fragment (Tyr283-Trp284-Ala285-Pro286-Pro287) położony w pobliżu centrum aktywnego przyjmuje konformację otwartą wskutek niemożności utworzenia wiązania wodorowego między Pro287 i ugrupowaniem karbonylowym Tyr283. Centrum katalityczne enzymu znajduje się we wnęce rozpoczynającej się za karboksylowym końcem struktury β . W jego skład wchodzi reszty His211 oraz Cys244 położone odpowiednio w pętlach S7-S7' oraz S8-H8, a także, prawdopodobnie, reszta Glu152 wchodząca w skład pętli S5-H5.

1.5.4 Budowa domeny IgSF

Opuszczając domenę B jako nić 10, łańcuch polipeptydowy enzymu od pozycji Thr352 przechodzi w domenę IgSF.¹⁶⁹ Organizacja przestrzenna tej złożonej z 7 nici domeny o wydłużonym kształcie pozwala sklasyfikować ją jako motyw strukturalny nazywany β -beczką. Budujące ją łańcuchy są ułożone i połączone jak w domenach IgG, z tą różnicą, że łączące je pętle są krótsze. Wyjątkiem jest motyw β -skreću spinający SC i SC', który wystaje poza strukturę beczki. Nić SA przecina najpierw nić SG i biegnie dalej antyrównoległe do SB, następnie skręca i jako SA' układa się wzdłuż SB. Nić połączona z SC poprzez strukturę spinki do włosów, dzięki temu nazwana SC', na

swoim C-końcu tworzy pętlę o strukturze β -spinki do włosów stanowiącą łącznik z SE. Taka budowa omawianej domeny jest charakterystyczna dla enzymów bakteryjnych. W RgpB domena IgSF nie zawiera typowego mostka disiarczkowego stanowiącego klamrę między SB i SF. Funkcję tą przejmują prawdopodobnie dwie reszty: zajmująca odpowiednią pozycję reszta Cys373 z łańcucha SB, której łańcuch boczny wnika do hydrofobowego rdzenia i oddziałuje z drugą z reszt - Val417 z SF. Przy powierzchni, po prawej stronie domeny (rysunek 1.17) pętla SC-SC' oraz SE-SF formują zagłębienie, w którym występują zgrupowania reszt kwasowych – odpowiednio Asp384-Asp-Gly-Asp387 i Glu405-Ser-Ile-Ala-Asp-Glu410. Powyżej tego miejsca pętla SC-SC' oraz łącznik SF-SG zbliżają się do domeny katalitycznej, co umożliwia zaistnienie oddziaływań o charakterze polarnym między pierwszą z pętli i fragmentem łączącym obie domeny oraz oddziaływań typu van der Waalsa łącznika SF-SG z pętlą H1-S2 domeny katalitycznej. Pomędzy opisanymi miejscami kontaktu obu domen występuje zbudowana głównie z reszt hydrofobowych wnęka wypełniona wodą.

1.5.6 Miejsce aktywne, podjednostki wiążące substrat i mechanizm katalityczny gingipain R*

Granice miejsca aktywnego gingipainy R i jego najbliższego otoczenia usytuowanych na prawie płaskiej powierzchni domeny B są wyznaczone przez nie His211-Glu214, wznoszącą się część Ala243-Val245, długi ułożony równolegle segment łączący S9-H9 oraz przebiegający prostopadle fragment Glu152-Asp163.

W centrum eksponowana jest reszta Cys244, a także wystający od dołu imidazolowy łańcuch boczny His211 z jego atomem N δ 1 oddalonym o 5,5 Å od atomu S γ Cys244 we wszystkich RgpB. Na lewo od Cys244 otwiera się głęboka kieszeń S1, z wystającymi z dna Val242 i Thr209, funkcjonującą jak „przykrywką” indolową częścią Trp284, która zamyka kieszeń od góry oraz wnosząca ujemnie naładowany łańcuch boczny resztą Asp163, która tworzy wiązania wodorowe z atomami azotu guanidynowego ugrupowania łańcucha bocznego Arg wiążanego substratu. We wnętrzu tej, w dolnej części, wyeksponowane są również łańcuchy boczne reszt His211 oraz położonego na lewo od niej Glu152. Ich wzajemna relacja w przestrzeni wskazuje na możliwość tworzenia wiązania wodorowego

* Tekst tego podrozdziału powstał w oparciu o fragment pracy magisterskiej²⁵⁴ autora niniejszej dysertacji i zawiera autocytywanie. Przy czym, został on w znacznym stopniu zmodyfikowany, uzupełniony o nowe dane i wzbogacony o dodatkowe komentarze i schematy.

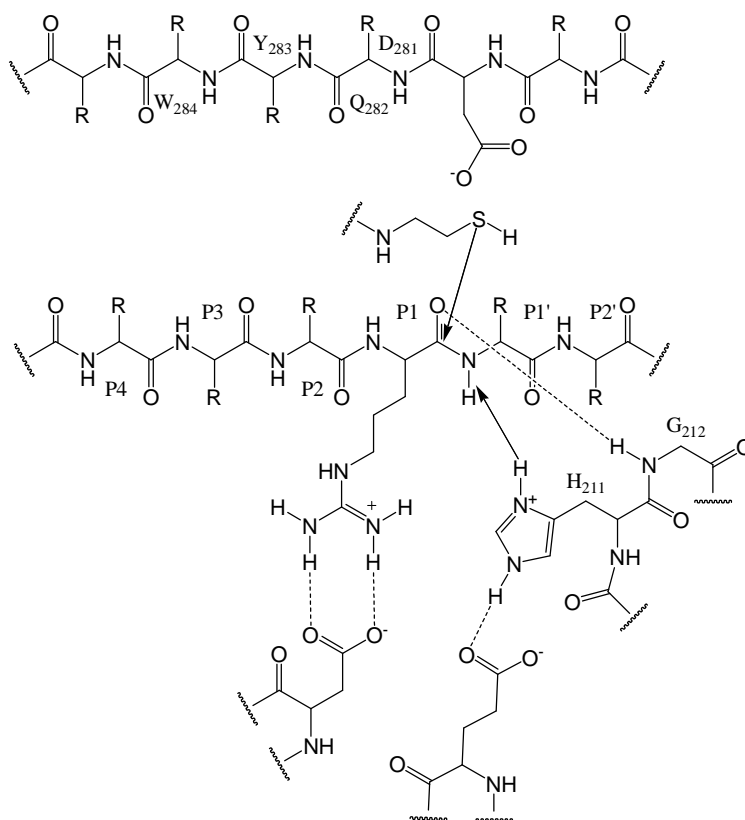
między atomem azotu N ϵ 2 His211 i atomami tlenu ugrupowania karboksylowego Glu152. Potwierdzałyby to postulowaną rolę obu reszt, z których pierwsza byłaby donorem protonu dla odszczepianej części aminowej hydrolizowanego przez enzym wiązania, a druga stabilizowałaby ładunek dodatni pierścienia imidazolowego tej pierwszej. Wyniki badań krystalograficznych sugerują jednak, że odległość między resztami jest zbyt duża i oddziaływanie między nimi zachodzi poprzez jon metalu pochodzący z buforu krystalizacyjnego.

Sposób wiązania liganda w miejscu aktywnym RgpB opisano na podstawie jedynej dostępnej struktury krystalicznej zdeponowanej w PDB (kod 1CVR). Stwierdzono, że peptydowy inhibitor D-Phe-L-Phe-L-Arg-CH₂Cl wiąże się z atomem siarki S γ Cys244 przez grupę metylenową wiązaniem kowalencyjnym. Grupa karbonylowa liganda tworzy wiązania wodorowe z atomami azotu reszt N Gly212 i N Cys244, pełniących rolę wnęki wiążącej oksyanion. Łańcuch inhibitora układa się wzdłuż segmentu Gln282-Trp284 RgpB tworząc z nim dwuniciową strukturę β z wiązaniem wodorowym pomiędzy atomem tlenu Gln282 i grupą NH reszty P1 oraz dłuższym pomiędzy grupą NH Trp284 i atomem tlenu Phe reszty P3. Łańcuch boczny Arg-P1 wiązany jest w kieszeni S1 tworząc mostek solny typu 2N-2O z łańcuchem bocznym Asp163, a także wiązania wodorowe pomiędzy atomami azotu N ϵ i N ζ grupy guanidylowej a karbonyłowymi atomami tlenu reszt Tyr283, Trp284 i Gly210. Ta wąska szczelina S1 przykrywana hydrofobowym „wieczkiem” i ograniczona resztami zdolnymi formować wiązania wodorowe określa silne preferencje enzymu względem reszt Arg w pozycji P1 ligandów. Dodatkowo swój wkład w kształtowanie specyficzności wnęki S1 wnosi reszta Met288. Odległość atomu S δ jej łańcucha bocznego od atomu N ζ reszty Arg liganda sprzyja wytworzeniu wiązania wodorowego.

Dotychczas nie opisano struktury krystalicznej gingipainy K. Dysponując sekwencją aminokwasów w enzymie²⁰⁵, na podstawie zgodności ze strukturą pierwszorzędową RgpB zaproponowano model strukturalny Kgp. Bazując na nim założono, że w Kgp w miejscu Met288 występuje reszta Tyr, której grupa fenolowa może być zwrócona do kieszeni S1 i stanowić dodatkowy donor wiązania wodorowego dla grupy aminowej reszty P1 inhibitora zawierającego w tej pozycji preferowaną resztę Lys. Reszta 288, podobnie jak w przypadku RgpB, odgrywa

istotną rolę w dyskryminowaniu innych niż Lys-P1 ligandów miejsca aktywnego w enzymie i może określać specyficzność K_{gp}.

Reszty P2 i P3 inhibitora wystają nad powierzchnię enzymu i oddziałują ze znajdującą się w pobliżu resztą Tyr283. Badania z wykorzystaniem modelowania molekularnego wykazały, że polipeptydowy ligand złożony z L-aminokwasów może wiązać się z miejscem aktywnym zajmując przestrzeń od *N*-końcowej części helisy 9 domeny B, wzdłuż segmentu Asp281-Tyr283, aż do fragmentu His211-Glu214 oddziałując tam z łańcuchem głównym enzymu poprzez formowanie wiązań wodorowych z resztami w obszarze S5 do S3'. Łańcuchy boczne reszt P4 i P2 liganda mogą zagnieżdżać się w hydrofobowo-kwaśnym zagłębieniu, podczas gdy reszta P3 może oddziaływać swoim łańcuchem bocznym z indolowym „wieczkiem” Trp284. Prawdopodobne są również oddziaływania łańcuchów bocznych reszt P1' lub P2' z ugrupowaniem karboksylowym Asp281 (rysunek 1.18).

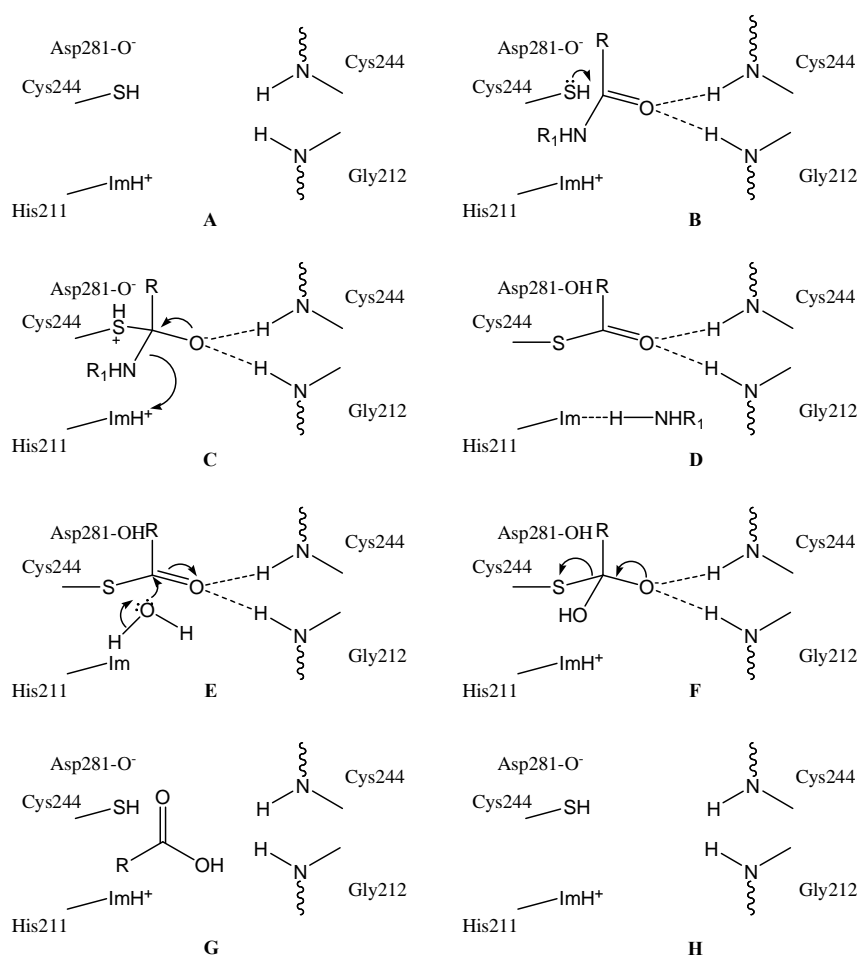


Rysunek 1.18: Sposób wiązania substratu w centrum aktywnym gingipainy R2

Wynika z tego, że RgpB wiąże peptydowe substraty przede wszystkim poprzez oddziaływania między głównymi łańcuchami, przy czym w uzyskiwaniu

specyficzności nie do pominięcia jest zarówno rola oddziaływań P1-Arg-S1, jak i towarzyszących im interakcji P4-S4, P2-S2 oraz P1'-S1'.

Opierając się na przytoczonym powyżej opisie miejsca aktywnego gingipainy R zaproponowano mechanizm reakcji katalizowanych przez enzym.¹⁶⁹ Odpowiednio usytuowana grupa karbonylowa hydrolizowanego wiązania peptydowego Arg-Xaa reaguje z atomem siarki S γ łańcucha bocznego katalitycznej reszty Cys244. Atakowi nukleofila towarzyszy polaryzacja C=O we wnęce wiążącej oksyanion (schemat 1.15, **B**). Reakcję ułatwia odpowiednia orientacja przestrzenna orbitalu z wolną parą elektronową atomu S γ , którą wymusza oddziaływanie z grupą NH Gln282. Kwaśny proton na atomie siarki hemitioketalu, tworzonego po nukleofilowym ataku grupy tiolowej na karbonylowy atom węgla, może być łatwo przeniesiony na znajdującą się najbliżej grupę karboksylową Asp281.



Schemat 1.15: Proponowany mechanizm proteolizy peptydowego substratu przez RgpB: A) wolny enzym, B) nukleofilowy atak wolnej pary elektronowej atomu siarki łańcucha bocznego Cys244 na ugrupowanie karbonylowe wiązania peptydowego, C) tetraedryczny produkt pośredni stabilizowany przez resztki wiążące oksyanion, D) protonowanie odchodzącego fragmentu aminowego przez pierścień imidazolowy His211, E) nukleofilowy atak cząsteczki wody na utworzony tioester, F) formowanie tetraedrycznego hemitioketalu, G) uwolnienie produktu karboksylowego, H) odtworzenie wolnego enzymu

Równocześnie grupa imidazolowa His211 położona po przeciwnej stronie hydrolizowanego wiązania peptydowego wraz z grupą karboksylową Glu152 obraca się w kierunku atomu azotu grupy odchodzącej Xaa. Silnie ujemny potencjał powierzchniowy oraz właściwie położona reszta Glu152 stabilizuje imidazolowy pierścień His211 w formie sprotonowanej umożliwiając tym samym przekazanie protonu na odchodzącą grupę amoniową promując rozerwanie wiązania C-N w substracie oraz uwolnienie fragmentu C-końcowego. Tioester pozostający po uwolnieniu fragmentu C-końcowego jest hydrolizowany przez cząsteczkę wody. Następnie grupa imidazolowa His211 i atom siarki S γ Cys244 ulegają protonowaniu, czemu towarzyszy uwalnianie części aminowej substratu.

1.5.7 Syntetyczne i naturalne inhibitory gingipain - aktualny stan wiedzy oraz perspektywa dla dalszych badań i zastosowań

„Zarówno gingipainy R jak i gingipaina K, z ich specyficzną aktywnością i zdolnością do unikania inaktywacji przez proteazy gospodarza, produkowane w znaczących ilościach przez *P. gingivalis*, są bezpośrednio odpowiedzialne za rozwój objawów paradontozy. W szczególności dotyczy to powstawania charakterystycznego płynu dziąsłowego w szczelinach uszkodzonego dziąsła, akumulacji neutrofilów oraz krwawienia, które mają podstawowe znaczenie dla przeżywania i proliferacji tego mikroorganizmu w tkankach przyzębia. Otrzymanie związków chemicznych, które skutecznie zablokowałyby działanie tych podstawowych czynników zjadliwości patogenu, niezbędnych do podtrzymania jego funkcji życiowych, może być przełomowe w badaniach nad opracowaniem nowoczesnej strategii w profilaktyce i leczeniu schorzeń przyzębia. Jest to wystarczającym uzasadnieniem dla działań zmierzających do uzyskania potencjalnych inhibitorów gingipain. Dwa aspekty dodatkowo zachęcają do podjęcia prac z zakresu modelowania odpowiednich związków, jak i syntezy najbardziej obiecujących spośród zaprojektowanych cząsteczek. Po pierwsze jest to fakt dość szczególnej specyficzności substratowej gingipain, a co się z tym wiąże – wysokiej selektywności potencjalnych inhibitorów. Po drugie, w zaatakowanym organizmie brak jest skutecznych naturalnych inaktywatorów gingipain.

Dodatkowym akcentem nadającym wysoką rangę przedsięwzięciu jest związek między nieleczoną paradontozą a mogącymi rozwinąć się w konsekwencji

schorzeniami. Tkanki przyzębia objęte przewlekłymi stanami zapalnymi stają się potencjalnym ogniskiem wysiewowym, z którego patogen może łatwo migrować poprzez krwiobieg do wielu narządów inicjując tam wtórne procesy zapalne.”²⁵⁴ Wykazano istotny związek między nieleczoną paradontozą i rozwojem chorób układu krążenia, w tym miażdżycy naczyń i choroby wieńcowej serca,^{186,187} układu oddechowego – zapalenie płuc,¹⁸⁸ układu nerwowego – stwardnienie rozsiane¹⁸⁹ oraz zaburzeniami przebiegu ciąży, w tym przedwczesnym porodem i niską masą ciała noworodków.¹⁹⁰

Nie można bagatelizować również pozamedycznych korzyści wynikających z otrzymania niskocząsteczkowych inhibitorów gingipain. Przy ich pomocy można prowadzić dalsze badania w celu jeszcze lepszego zrozumienia mechanizmu katalitycznego docelowych enzymów. Zgromadzone w nich wyniki pozwolą również udoskonalić wstępny model domeny katalitycznej gingipainy K, stworzony przez doktor Jolantę Grembecką, w oparciu o znaną strukturę gingipainy R.

Wszystkie przytoczone powyżej powody wskazują na atrakcyjność gingipain jako celu dla projektowania specyficznych inhibitorów. Mimo tego, lista zbadanych dotychczas syntetycznych i naturalnych związków hamujących aktywność gingipain jest niezbyt długa i zawiera tylko nieliczne przykłady cząsteczek zaprojektowanych jako specyficzne inaktywatory Kgp i RgpB.¹⁹¹

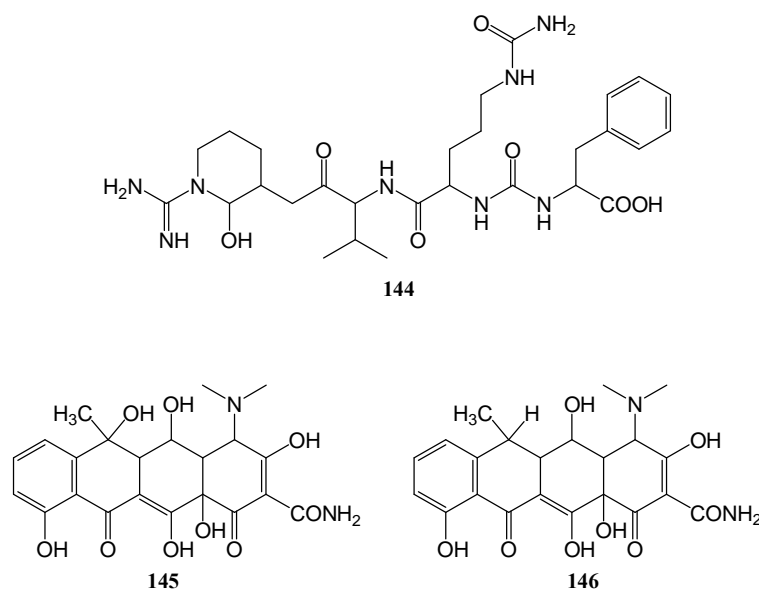
1.5.7.1 Związki pochodzenia naturalnego hamujące aktywność gingipain

Najliczniej reprezentowaną grupę związków pochodzenia naturalnego zidentyfikowanych jako skuteczne inhibitory gingipain stanowią polipeptydy i białka. Ludzkie histatyny, w szczególności histatyna-5 wydzielana w ślinie, wykazują własności inhibitorowe zarówno względem Kgp, jak i RgpB. Zmierzone w tym wypadku wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 13,8 μM i 22,0 μM .¹⁹²

Antyapoptotyczny czynnik bakulowirus P35 jest znanym naturalnym inhibitorem kaspaz. Podobieństwo strukturalne kaspaz i innych proteaz cysteinowych z klanu CD było przesłanką do zbadania jego aktywności względem proteaz wykazujących podobny sposób sfałdowania.¹⁹³ Najefektywniej hamował Kgp ze stałą K_i poniżej 0,2 nM. Podobnym badaniom poddano należący do serpin wirusowy modulator odpowiedzi cytokinowej CrmA z wirusa ospy bydłowej. Okazało się, że jego zmutowana postać (mutacja punktowa Asp>Lys) efektywnie hamuje Kgp ze stałą $K_i < 0,2$ nM.

Potwierdzono także własności inhibitorowe analogu oligopeptydu - fenyloalanylo-ureido-cytrulinylo-walilocykloarginalu (FA-70C1) izolowanego ze *Streptomyces* (**144**, rysunek 1.19).¹⁹⁴ Hamował on aktywność gingipainy R *in vitro* ze stałą K_i w zakresie od 1-10 nM. W badaniach na tkankach wyraźnie zmniejszał stopień degradacji różnych białek przez Rgp, które w warunkach naturalnych są źródłem aminokwasów dla patogenu. Okazał się również skutecznym środkiem redukującym stymulowany przez gingipainy efekt zwiększania przepuszczalności naczyń krwionośnych u organizmów kontrolnych, którym zaaplikowano ekstrakt komórkowy z *P. gingivalis*.

Aktywność względem Kgp wykazały również antybiotyki z grupy tetracyklin (**145**, **146**, rysunek 1.19).¹⁹⁵ Są one nieodwracalnymi inhibitorami gingipain hamującymi całkowicie ich aktywność przy stężeniu 100 mikromoli, przy czym wykazują wyższą aktywność wobec enzymów argininowych. DoksyCYklina (**146**) hamowała aktywność RgpB w 50 % przy stężeniu 3 μM a Kgp przy 20 μM . W badaniach *in vivo* ograniczała efekt związany ze zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych (VPE) będący jednym z podstawowych objawów paradontozy.



Rysunek 1.19: Struktury wybranych inhibitorów gingipain pochodzenia naturalnego

Ostatnio opublikowano wyniki badań nad wpływem stałego pozostałości po dializie soku z borówki amerykańskiej *Vaccinium macrocarpon* na aktywność proteolityczną enzymów z trzech szczepów bakteryjnych kojarzonych ze schorzeniami przyzębia: *P. gingivalis* (ATCC 33277), *T. denticola* (ATCC 35405) oraz *T. forsythia* (ATCC 43037).¹⁹⁶ Preparat ten zawierał 0.35% antocyjanin (0,055% cyjanidyno-3-galaktozydu,

0,003% cyjanidyno-3-glukozydu, 0,069% cyjanidyno-3-arabinozydu, 0,116% peonidyno-3-galaktozydu, 0,016% peonidyno-3-glukozydu i 0,086% peonidyno-3-arabinozydu) oraz 65,1% proantocyjanidyn. Preparat wyraźnie hamował aktywność Rgp oraz Kgp w buforze stosowanym do inkubacji komórek bakteryjnych. Aktywność Rgp spadała do 50% przy stężeniu 75 mg/ml preparatu w buforze pomiarowym, podczas gdy Gingipaina K była inaktywowana w 50% już przy stężeniu 25 mg/ml.

1.5.7.2 Syntetyczne inhibitory gingipain

Scharakteryzowane dotychczas syntetyczne inhibitory gingipain należą do różnych klas związków. Najliczniejszą grupę stanowią chlorometylketony (inhibitory RgpB i Kgp).¹⁹⁷ Część z nich jest bardzo skuteczna, co wynika między innymi z obecności w ich strukturze reaktywnego elektrofilowego ugrupowania chlorometylowego. Jednak kinetyka ich wiązania z enzymem istotnie zależy również od budowy peptydowej części cząsteczki (tabela 1.20).

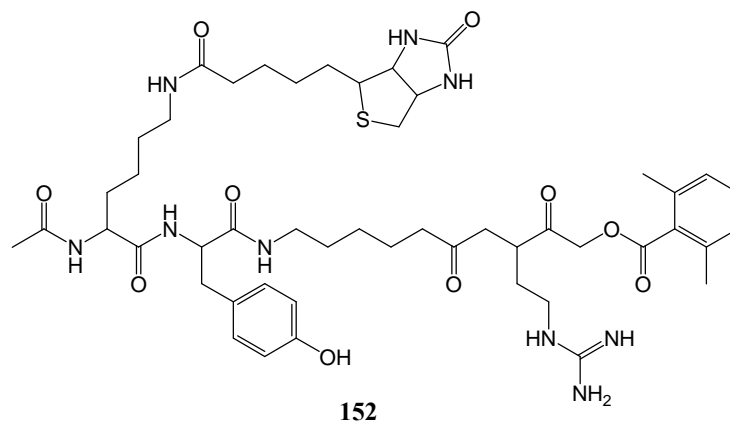
Tabela 1.20: Aktywność wybranych peptydowych ketonów chlorometylowych i acyloksymetyloketonu względem gingipain

Nr	Wzór inhibitora	RgpB	Kgp
		$k_{\text{ass}} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{ass}} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$ K
147	Phe-Pro-Arg-C(O)-CH ₂ Cl	22 220 000	1 108 000
148	Phe-Phe-Arg-C(O)-CH ₂ Cl	47 650 000	1 050 000
149	Tos-Lys-C(O)-CH ₂ Cl	13 500	79 910
150	Cbz-Phe-Lys-CH ₂ OCO-2,4,6-Me ₃ Ph	1920	4 200 000
151	Phe-Leu-Phe-C(O)-CH ₂ Cl	455	172

Podstawowym kryterium dyskryminującym ligand jest niedopasowanie do wnęki S1 enzymu. Dobrymi inhibitorami są tylko te cząsteczki, które spełniają wymagania substratowe odpowiedniej izoformy proteazy, tzn. w pozycji P1 zawierają odpowiednio Arg lub Lys.

Badano także acyloksymetyloketony. Związek **150** był użyty obok opisanych powyżej chlorometyloketonów do miareczkowania miejsca aktywnego gingipain. Szczególnie silnie hamował on Kgp.¹⁹⁷ Inny acyloksymetyloketon (**152**, rysunek 1.20) został zaprojektowany jako inhibitor znakujący na skutek powinowactwa do enzymów

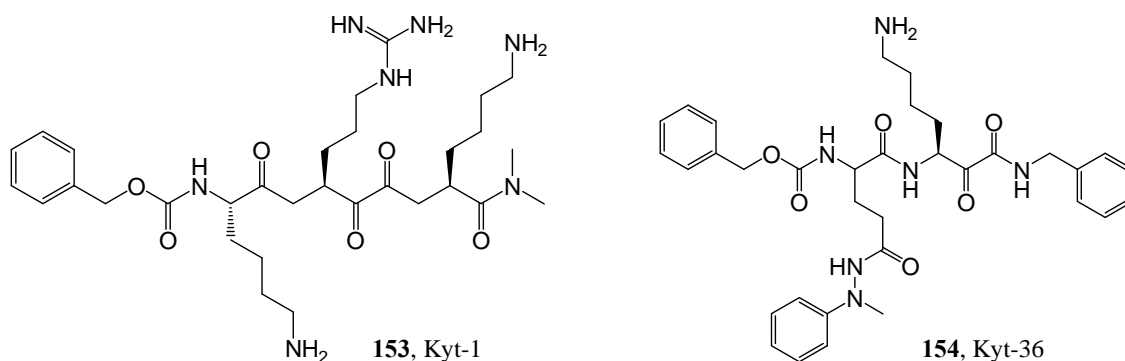
hydrolizujących wiązanie Arg-X. Wykorzystano go między innymi do oznaczania stężenia i aktywności Rgp w badaniach nad mechanizmem aktywacji zymogenu Rgp.¹⁹⁸



Rysunek 1.20: Struktura ketonu acyloksymetylowego używanego jako substancja znakująca w badaniach nad aktywacją zymogenu Rgp

W 2004 roku opublikowano pracę opisującą syntezę ketopeptydów Cbz-Lys-Arg-CO-Lys-N(CH₃)₂ (**153**, KYT-1, odwracalny inhibitor RgpB) oraz Cbz-Glu-(NHN(CH₃)-Ph)-Lys-CONHCH₂Ph (**154**, KYT-36, odwracalny inhibitor Kgp) (rysunek 1.21).¹⁹⁹ Zostały one zaprojektowane w oparciu o struktury polipeptydów należących do rodziny histatyn. Są to bogate w reszty histydyny polipeptydy o własnościach antybakteryjnych i przeciwgrzybiczych wydzielane przez ślinianki człowieka. Uważa się je za jedne z pozaimmunologicznych czynników obronnych organizmu w jamie ustnej.¹⁹⁹ O wyborze aminokwasów do syntezy inhibitorów zdecydowały wyniki sekwencjonowania fragmentów będących produktami degradacji histatyn 1, 3 i 5 występujących w ślinie w największym stężeniu (80-90% wszystkich 10 histatyn) przez Rgp i Kgp. Okazało się, że preferowanym miejscem hydrolizy przez Rgp jest wiązanie Arg-Lys w sekwencji Lys-Arg-Lys. W efekcie zaprojektowano **153**, dla którego stała K_i wynosi $1,3 \times 10^{-10}$ M. W przypadku enzymu lizynowego statystycznie najczęściej hydrolizowanym wiązaniem było Lys-His w sekwencji Glu-Lys-His. Chociaż zaprojektowane inhibitory Kgp z innymi resztami aminokwasowymi w pozycji P2 i P1' również charakteryzowały się niską stałą K_i . Niemniej **154** był najskuteczniejszym odwracalnym inhibitorem Kgp ze stałą $K_i = 7,5 \times 10^{-11}$ M. Zarówno pochodna **153** jak i związek **154** okazały się wysoce selektywne wykazując aktywność nawet kilka rzędów niższą względem proteaz cysteinowych innych niż gingipainy. Oba inhibitory

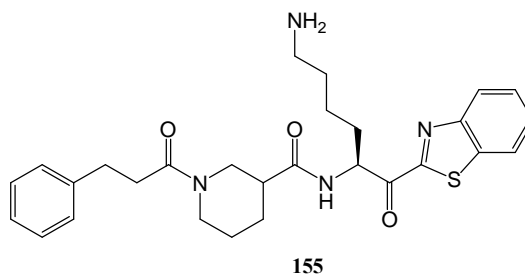
pozytywnie przeszły testy, w których oceniano korelację między inhibicją najważniejszych czynników zjadliwości *P. gingivalis*, a zmniejszaniem się typowych objawów związanych z infekcją tym patogenem. Zarówno w testach na kulturach tkankowych jak i na zwierzętach nie wykazywały one toksyczności.



Rysunek 1.21: Odwracalne inhibitory gingipain zaprojektowane na podstawie analizy struktur produktów degradacji histatyn przez gingipainy

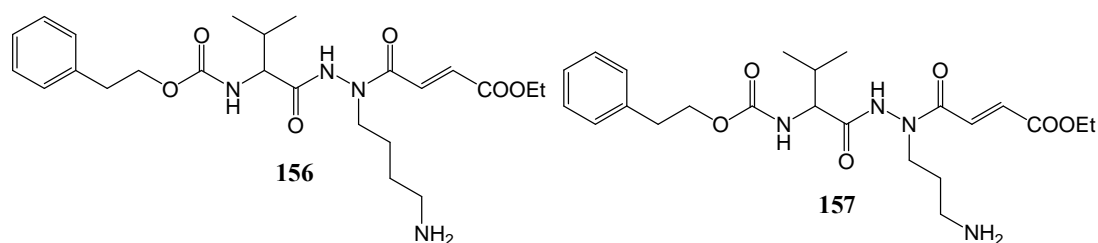
Pierwszą pracą opisującą projektowanie i otrzymywanie selektywnego inhibitora Kgp (struktura **155**, rysunek 1.22) w 2002 roku opublikowali Curtis i współpracownicy w *Infection and immunity*.²⁰⁰

Związek ten zaprojektowano metodami modelowania molekularnego przy pomocy technologii RAPID (Rational Proteinase Inhibitor Design) opatentowanej przez autorów.²⁰⁰ Inhibitor **155** okazał się skutecznym odwracalnym inhibitorem Kgp ($K_i = 0,9 \text{ nM}$) i jednocześnie był dyskryminowany przez inne proteazy o podobnych wymaganiach substratowych. Wykazywał on ponad trzydziestokrotnie niższą aktywność względem trypsyny ($K_i = 30 \text{ nM}$) oraz był 120 000 razy mniej aktywny względem katepsyny B ($K_i = 115 \text{ }\mu\text{M}$). Nie hamował natomiast gingipain R w stężeniu do $100 \text{ }\mu\text{M}$.



Rysunek 1.22: Struktura selektywnego odwracalnego inhibitora Kgp zaprojektowanego przy użyciu technologii RAPID

Prace nad aza-epoksydowymi inhibitorami kaspaz przyniosły wyjątkowo dobre rezultaty w postaci wysoce selektywnych inaktywatorów, które nie przejawiały aktywności względem pozostałych proteaz z klanu CD, w tym kalpain, innych proteaz cysteinowych (papaina, katepsyna B) oraz serynowych.²⁰¹ Wyniki te stały się podstawą do opracowania nowego typu inhibitorów aza-peptydowych, zawierających w strukturze fragment C=C (**156**, **157**, rysunek 1.23). Okazały się one efektywnymi inhibitorami proteaz cysteinowych z klanu CD.²⁰² Wprowadzenie dodatkowego atomu azotu w miejsce atomu węgla C_α do struktury tych cząsteczek zwiększa możliwości ich modyfikacji. Ugrupowanie karbonylowe fragmentu zawierającego wiązanie C=C pełni tutaj rolę taką jak ugrupowanie karbonylowe wiązania peptydowego hydrolyzowanego w substracie. Związki **156** i **157** okazały się efektywnymi inhibitorami Kgp.



Rysunek 1.23: Nieodwracalne aza-peptydowe inhibitory Kgp zawierające w strukturze resztę estru kwasu fumarowego, reagującą z katalityczną resztą Cys

Tabela 1.21: Aktywność aza-peptydowych γ -okso- α,β -nienasyconych estrów względem wybranych proteaz z klanu CD

Nr	k_{ass} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{ass} [M ⁻¹ s ⁻¹]
	klostropaina	gingipaina K
156	40 750 ± 7600	3 280 000 ± 652 000
157	728 ± 169	927 000 ± 59 000

Opublikowano także dane na temat inhibitorów benzamidynowych skierowanych na RgpB.²⁰³

Większość z przedstawionych w tym rozdziale związków została zsyntezowana jako analogi substratów lub pozyskana ze źródeł naturalnych. Pierwsze niskocząsteczkowe inhibitory gingipain, zaprojektowane na podstawie struktury docelowego enzymu, zawierające w strukturze zmodyfikowane reszty Lys/Arg oraz podstawniki

nieaminokwasowe, zostały opisane w publikacji, która była rezultatem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy.²⁰⁴ Te oraz dalsze wyniki prac związanych z projektowaniem i otrzymywaniem specyficznych inhibitorów RgpB i Kgp na bazie modelu struktury kompleksu RgpB z inhibitorem D-Phe-L-Phe-L-Arg-CH₂Cl są szczegółowo omawiane w kolejnych rozdziałach dysertacji dotyczących badań własnych autora.

2 Cel pracy

W pracy doktorskiej autor podjął się rozwiązać cztery główne problemy związane z otrzymywaniem inhibitorów gingipain. Pierwszym celem była optymalizacja struktury ligandów z *C*-terminalnym ugrupowaniem chlorometyloketonowym, zbudowanych z dwóch lub trzech reszt komplementarnych do wnęk wiążących S_n gingipain. Realizowano go w trzech etapach: opracowanie procedur syntetycznych, w tym dobór metody usuwania reszt ochronnych z grup aminowych docelowych związków, optymalizacja warunków izolacji odblokowanych inhibitorów z mieszanin reakcyjnych oraz ocena właściwości inhibitorowych otrzymanych pochodnych. Wyniki dotyczące tej części badań własnych uzupełniają i znacznie rozszerzają rezultaty badań wstępnych dotyczących inhibicji gingipain zaprezentowane w pracy magisterskiej autora.²⁵⁴

Drugim problemem było otrzymanie aktywnych pochodnych o wyższej selektywności w reakcji z grupą tiolową cysteiny badanych enzymów w porównaniu do chlorometyloketonów otrzymanych w pierwszym etapie. W tym celu zaplanowano syntezę cząsteczek, w których strukturze są obecne reszty P_n wyselekcjonowane na podstawie wyników badań kinetycznych przeprowadzonych dla chlorometyloketonów oraz odpowiedni fragment reagujący z centrum aktywnym gingipain zawierający w strukturze ugrupowanie o niższej elektrofilowości. Wyboru grupy reagującej z katalityczną resztą cysteiny gingipain dokonano na podstawie danych literaturowych dotyczących inhibicji proteaz cysteinowych, zaprezentowanych w rozdziale 1.4. Ostatecznie do syntezy zakwalifikowano pięć różnych klas związków: oksirany, acyloksymetyloketony, α,β -nienasycone estry/kwasy oraz pochodne kwasu fumarowego lub maleinowego.

Trzecim z postawionych problemów było rozbudowanie struktury inhibitorów o dodatkowy fragment oddziałujący z wnęką S1' gingipain w celu określenia jej znaczenia dla oddziaływania liganda z enzymem.

Czwarte zadanie badawcze to, w przypadku inhibitorów zawierających we fragmencie P1 wiązanie nienasycone C=C, epoksydacja takich pochodnych i znalezienie warunków odblokowania docelowych oksiranów.

Wszystkie zaprojektowane pochodne musiały być otrzymane w postaci wolnej (bez grup blokujących), co wiąże się z koniecznością doboru metody usuwania reszt ochronnych dla wszystkich typów zaplanowanych cząsteczek, a następnie opracowania

warunków wydzielania końcowych związków z mieszanin reakcyjnych. Mimo, iż ta część pracy stanowi integralny etap w syntezie inhibitorów, jest ona szczególnie złożona ze względu na różnorodność i reaktywność grup funkcyjnych w docelowych związkach i może być uznana za odrębny problem badawczy.

Otrzymane związki posłużyły przede wszystkim do badań, mających dostarczyć danych do opracowania metodami obliczeniowymi dokładniejszego modelu 3D wnek wiążących gingipainy K, na bazie jego wersji wstępnej zaproponowanej przez Dr Jolantę Grembecką.

W oparciu o wyniki badania kinetyki zaniku resztkowej aktywności gingipain w obecności otrzymanych inhibitorów, proponowany model gingipainy K oraz strukturę krystaliczną gingipainy R2, w niniejszej dysertacji przedstawiono analizę oddziaływań zsyntetyzowanych ligandów z docelowymi enzymami.

3 BADANIA WŁASNE

3.1 Projektowanie inhibitorów gingipain

3.2 Chlorometyloketony

3.2.1 Synteza

3.2.2 Analiza oddziaływań chlorometyloketonów z RgpB

3.2.3 Analiza oddziaływań inhibitorów z Kgp

3.3 Akceptory typu Michael'a

3.3.1 Założenia, projektowanie

3.3.2 Pochodne α,β -nienasycone

3.3.2.1 Retrosynteza

3.3.2.2 Synteza

3.3.2.2.1 *N*-Acylowane estry lizyny i argininy

3.3.2.2.2 Przekształcanie *N*-acylowanych estrów lizyny i argininy w aldehydowe prekursorzy α,β -nienasyconych amidów

3.3.2.2.2.1 Otrzymywanie *N*_ε-Cbz-*N*_α-fenylopropionylolizynalu

3.3.2.2.2.2 Otrzymywanie pochodnych aldehydowych poprzez utlenienie odpowiednich alkoholi

3.3.2.2.2.3 Otrzymywanie pochodnych aldehydowych poprzez redukcję amidu

Weinreba

3.3.2.2.3 Otrzymywanie pochodnych α,β -nienasyconych z *N*_α-acylowanych Lys(Cbz)-H i Arg(Cbz)₂-H

3.3.3 Synteza pochodnych γ -okso- α,β -nienasyconych

3.3.3.1 Planowanie syntezy

3.3.3.2 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych estrów z β -ketoestrów (ścieżka I)

3.3.3.3 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych estrów z bromometyloketonów (ścieżka II)

3.3.3.4 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych estrów (amidów) w oparciu o reakcję HWE..

3.3.3.4.1 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych amidów w reakcji HWE z użyciem modyfikowanego reagenta fosforowego (ścieżka III)

3.3.3.4.2 Synteza γ -okso- α,β -nienasyconych estrów (amidów) z β -ketofosfonianów – pochodnych *N*-acylowanych estrów lizyny i argininy (ścieżka IV)

3.3.3.4.3 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconego kwasu z odpowiedniego estru

3.4 Epoksydy

3.4.1 Projektowanie inhibitorów, planowanie syntezy

3.4.2 Synteza

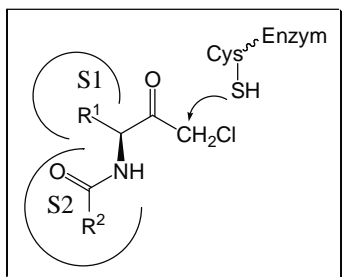
3.5 Acyloksymetyloketony

3.1 Projektowanie inhibitorów gingipain

W pierwszej części rozprawy opisano strategię otrzymywania inhibitorów proteaz cysteinowych polegającą na projektowaniu i syntezie cząsteczek zawierających w swojej strukturze elementy odpowiedzialne za specyficzne wiązanie we wnękach wiążących enzymu oraz fragmentu zdolnego do utworzenia kowalencyjnego wiązania z ugrupowaniem tiolowym cysteiny, kluczowym dla przebiegu reakcji enzymatycznej. Do tej samej koncepcji odwołano się w badaniach własnych.

W celu zaprojektowania nowych inhibitorów gingipain wykorzystano dostępność struktury kompleksu RgpB z inhibitorem D-Phe-L-Phe-L-Arg-CH₂Cl.²⁰⁵ Analiza sposobu wiązania liganda z resztami aminokwasowymi centrum aktywnego oraz kieszeni wiążących enzymu dostarcza szczegółowych informacji o ich budowie i pozwala zaprojektować związki do nich komplementarne, potencjalnie silnie i selektywnie oddziałujące z domeną katalityczną. Ponieważ nie rozwiązano dotychczas struktury gingipainy K, aby móc posłużyć się wybraną strategią projektowania nowych ligandów tego enzymu, konieczne było zaproponowanie trójwymiarowego modelu jej centrum aktywnego na podstawie struktury RgpB. Istotne podobieństwo sekwencji aminokwasowych obu enzymów uzasadnia wybór struktury RgpB jako matrycy do opracowania modelu 3D Kgp.

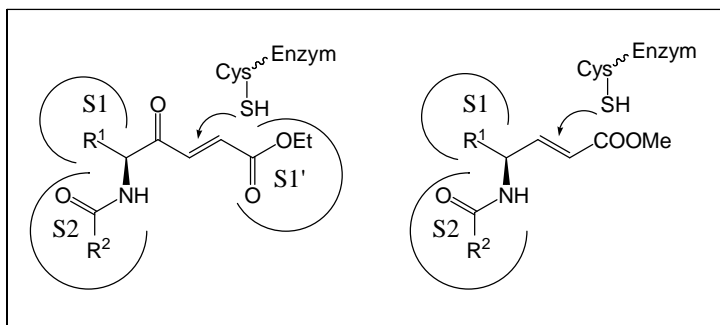
Specyficzność substratowa enzymów (Arg-Xaa, Lys-Xaa) ogólnie definiowała stałe fragmenty strukturalne w procesie modelowania nowych ligandów, którymi były reszta Lys w przypadku Kgp i reszta Arg w inhibitorach RgpB. Pozostałe fragmenty cząsteczek ligandów wygenerowano metodami modelowania molekularnego używając pakietu Ludi/InsightII,²⁰⁶ wykorzystując zasoby wbudowanej biblioteki fragmentów strukturalnych. Wybrane z uzyskanych na tej drodze struktur, zaprojektowanych tak, aby móc badać przy ich pomocy specyficzność kieszeni wiążących S_n enzymu, zsyntezowano i poddano testom kinetycznym. Związkami otrzymanymi i zastosowanymi na wstępnym etapie badań były *N*-acylowane chlorometyloketony, pochodne lizyny i argininy. Wyboru tej klasy związków dokonano przede wszystkim ze względu na ich wysoką reaktywność względem nukleofilowego ugrupowania tiolowego katalitycznej reszty cysteiny. Wyniki testów enzymatycznych *in vitro* pozwoliły wyselekcjonować podstawniki optymalnie wiązane we wnękach S₂ i S₃. Wybrane podstawniki P₂ stanowią konserwatywny fragment struktury bardziej rozbudowanych inhibitorów oddziałujących również z wnękami S_n enzymów (rysunek 3.1).



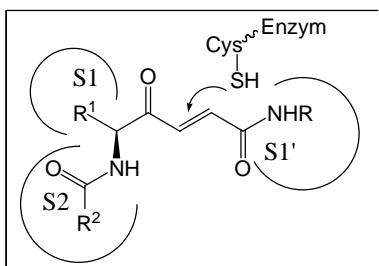
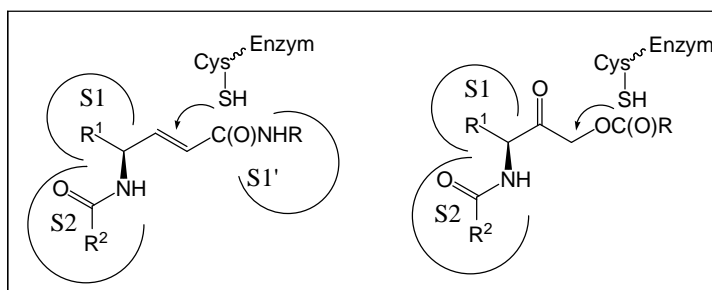
Chlorometyloketony zaprojektowane jako inhibitory Kgp i RgpB w celu dokładniejszego zbadania specyficzności wnęk wiążących Sn oraz zoptymalizowania reszt Pn

Akceptory Michael'a jako produkty pośrednie w syntezie zaprojektowanych epoksydów. Wiązanie nienasycone C=C w tych cząsteczkach jest podatne na atak ugrupowania tiolowego katalitycznej reszty Cys gingipain. Fragmenty R² przedstawionych struktur odpowiadają zoptymalizowanym resztom **P2**

N-acylowanych chlorometyloketonów wyselekcjonowanych na podstawie testów kinetycznych jako najaktywniejsze inhibitory Kgp i RgpB. Konstrukcja tych inhibitorów umożliwia ich rozbudowę po stronie Pn'.

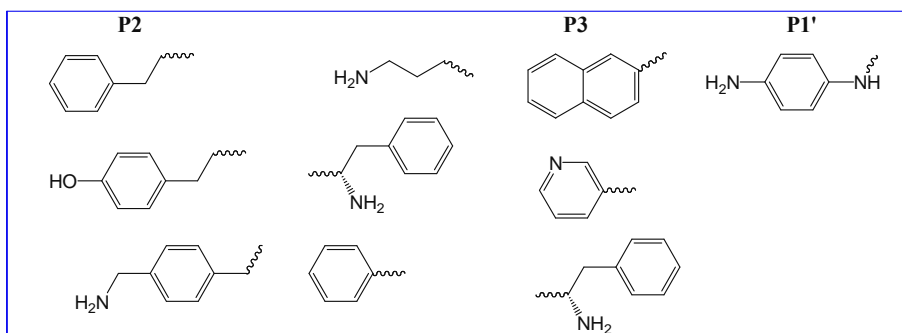


Akceptory Michael'a oraz acyloksymetyloketony zawierające w strukturze fragment oddziałujący z resztami wnęki S1' gingipain. Zaprezentowane pochodne amidowe są rozbudowanymi analogami pokazanych wyżej α,β -nienasyconych estrów.



Pochodne γ -okso- α,β -nienasycone dzięki obecności dodatkowego ugrupowania karbonylowego mają szansę na większą liczbę kontaktów w miejscu aktywnym gingipain.

W ramce poniżej pokazano reszty R², którym odpowiadają podstawniki **P2** oraz przedstawiono wyselekcjonowane reszty **P3** i **P1'** ligandów wybranych do syntezy.



Rysunek 3.1: Wzory ogólne różnych typów zaprojektowanych inhibitorów z uwzględnieniem ugrupowania reagującego z grupą SH katalitycznej reszty Cys; Podstawniki R¹ odpowiadają łańcuchom bocznym Lys/Arg. R = CH₂-2,5-(CF₃)₂-Ph w acyloksymetyloketonach lub **P1'** w pozostałych pochodnych

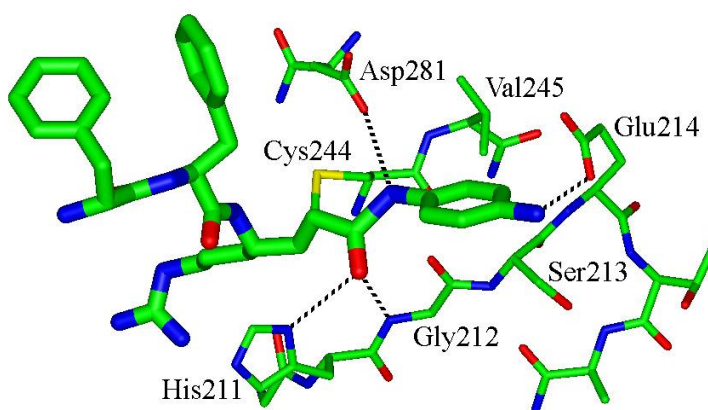
O ile w przypadku badania charakteru wnęk wiążących Sn gingipain użycie bardzo reaktywnych chlorometyloketonów w testach *in vitro*, dające gwarancję skutecznego ich wiązania we wnęce S1, było w pełni uzasadnione, o tyle zastosowanie ich przy próbie poprawiania selektywności w oddziaływaniu z akceptorami *in vivo* jest niemożliwe właśnie ze względu na ich wysoką reaktywność. Powszechne występowanie nukleofilowych ugrupowań tiolowych i hydroksylowych w związkach stanowiących składniki płynów ustrojowych prowadziłyby do szybkiej dezaktywacji potencjalnego inhibitora wskutek ich reakcji z elektrofilowym ugrupowaniem chlorometyloketonowym. W tej sytuacji prawdopodobieństwo kowalencyjnego związania liganda z docelowym enzymem byłoby znikome. Rozwiązaniem tego problemu może być wprowadzenie do cząsteczki liganda posiadającego zoptymalizowane podstawniki Pn ugrupowania, które byłoby mniej podatne na atak nukleofilowy. Kryterium to spełniają między innymi pochodne typu acyloksymetyloketonów, aminometyloketony, α,β -nienasycone estry, kwasy i amidy oraz epoksydy. Syntezę tych pochodnych planowano tak, żeby była możliwa ich rozbudowa po stronie Pn', co zwiększałoby liczbę oddziaływań liganda z cząsteczką enzymu, a tym samym specyficzność inhibitora (rysunek 3.2).

Zgodnie z uzyskanym metodami obliczeniowymi modelem (rysunek 3.2) przedstawiającym sposób wiązania α,β -nienasyconych pochodnych w centrum aktywnym gingipain, obecność w ich strukturze ugrupowań karbonylowych w bezpośrednim sąsiedztwie ulegającego reakcji układu C=C powinno sprzyjać tworzeniu sieci wiązań wodorowych z resztami enzymu otaczającymi wiązany ligand. Podobnie, przyłączenie do karboksylowego końca inhibitorów reszty fenylendiaminy, która spełnia kryterium komplementarności do wnęki S1' obu badanych gingipain, powinno skutkować zwiększeniem powinowactwa takich cząsteczek do centrum aktywnego docelowego enzymu. Założenia te opierają się na wynikach analizy oddziaływań modelowego α,β -nienasyconego amidu z resztami centrum aktywnego RgpB.

Struktura hipotetycznego α,β -nienasyconego amidu, która posłużyła do opracowania modelu sposobu wiązania tego typu związków przez gingipainy, została otrzymana *in silico* przy pomocy pakietu Ludi/InsightII poprzez podstawienie odpowiednią resztą ugrupowania chlorometyloketonowego w inhibitorze D-Phe-D-Phe-Arg-CH₂Cl, a następnie, po zoptymalizowaniu, zadokowana w centrum aktywnym RgpB.

W zaproponowanym modelu dla wszystkich badanych pochodnych nienasyconych zachowano odpowiednie oddziaływania z resztami wnek S2 i S1 gingipain przedstawione wcześniej dla chlorometyloketonów.

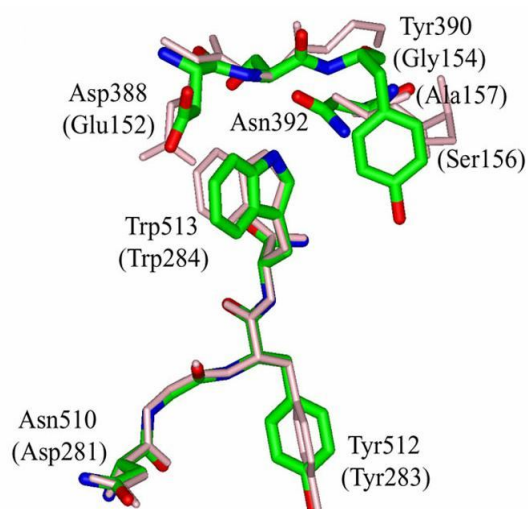
W przypadku α,β -nienasyconych estrów, dzięki obecności ugrupowania karbonylowego za fragmentem winylowym, po stronie C-końca inhibitora, możliwe jest powstawanie wiązania wodorowego pomiędzy atomem azotu pierścienia imidazolowego łańcucha bocznego His211 oraz z amidowym atomem azotu reszty Gly212. Ich amidowe analogi oprócz wymienionych oddziaływań, ze względu na obecność w ich strukturze podstawnika P1', mogą tworzyć dodatkowe wiązania wodorowe pokazane na rysunku 3.2. Na możliwość zachodzenia tego typu oddziaływań wskazuje wynikająca z obliczeń odpowiednia odległość (poniżej 3,5 Å) między amidowym atomem azotu reszty fenylenodiaminy i atomem tlenu łańcucha bocznego reszty Asp281 oraz między atomem azotu podstawnika aminowego pierścienia fenyloвого inhibitora i karbonylowym atomem tlenu łańcucha bocznego reszty Glu214, położonej w głębi wnęki S1'. Ponadto, pierścień fenylovery podstawnika P1' może być zaangażowany w oddziaływania hydrofobowe z łańcuchem bocznym Val245 oraz hydrofobowymi fragmentami reszty Ser213.



Rysunek 3.2: Sposób wiązania przykładowego α,β -nienasyconego amidu, pochodnej argininy zawierającej w strukturze resztę fenylenodiaminy komplementarną do wnęki S1' RgpB. Liniami przerywanymi zaznaczono wiązania wodorowe tworzące się między resztami budującymi wnęki wiążące enzymu i resztami inhibitora. Struktura liganda została pogrubiona (oznaczenia atomów: O - czerwony, N - niebieski, S - żółty)

W przypadku inhibitorów z wbudowaną resztą kwasu fumarowego odległość atomu tlenu ugrupowania karbonylowego reszty P1 i atomu azotu N_{α} reszty Cys244 sprzyja powstawaniu kolejnego wiązania wodorowego, co w efekcie powinno dodatkowo zwiększać powinowactwo inhibitora do centrum katalicznego.

Ze względu na bardzo duże podobieństwo w budowie kieszeni S1' obu gingipain, przedstawione wyżej wyjaśnienia uzasadniają wybór tej samej reszty P1' dla inhibitorów projektowanych dla Kgp i RgpB. Podobnie zaprezentowana analiza oddziaływania pozostałych fragmentów zaprojektowanych pochodnych nienasyconych z odpowiednimi resztami aminokwasowymi gingipain R, ze względu na liczne analogie strukturalne centrów aktywnych docelowych enzymów może być zastosowana dla Kgp (rysunek 3.3).



Rysunek 3.3: Analogie w budowie kieszeni wiążących S2 i S3 Kgp i RgpB. Atomy reszt budujących wnęki wiążące Kgp oznaczono: zielony - C, czerwony - O, niebieski - N. Wszystkie atomy reszt w RgpB oznaczono kolorem różowym.

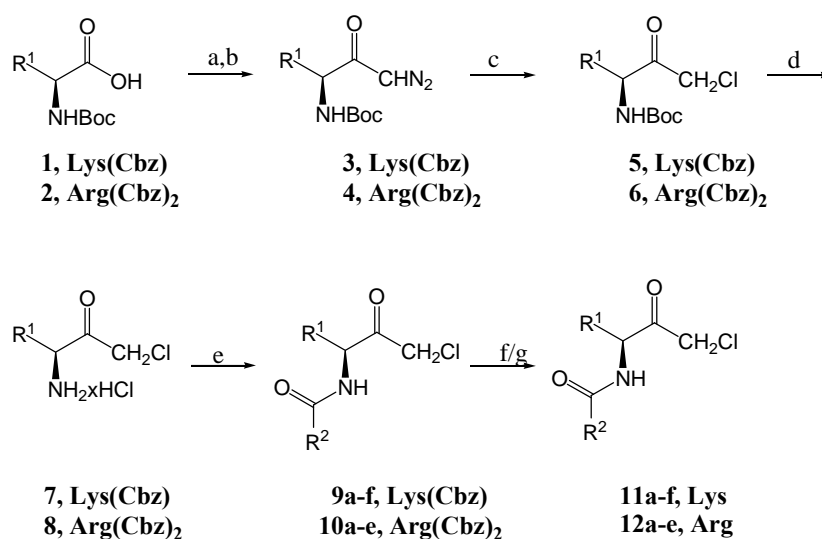
3.2 Chlorometyloketony

3.2.1 Synteza

W literaturze opisano dwa alternatywne podejścia do syntezy peptydowych chlorometyloketonów. Pierwsze z nich polega na przekształceniu odpowiedniego aminokwasu w chlorometyloketon, a następnie wydłużaniu łańcucha peptydowego inhibitora w kierunku *N*-końca.²⁰⁷ Stosując drugi sposób otrzymywania tej klasy związków najpierw syntezuje się peptyd o zaprojektowanej sekwencji, a dopiero wówczas *C*-końcową resztę cząsteczki przekształca się w chlorometyloketon.²⁰⁸ Opierając się na wynikach wstępnych prób syntezy chlorometyloketonów, autor zdecydował się na zastosowanie pierwszego z opisanych wariantów.

Zaprojektowane chlorometyloketony zsyntezowano wychodząc z optycznie czystych *L*-argininy i *L*-lizyny z odpowiednio zabezpieczonymi ugrupowaniami aminowymi. W przypadku inhibitorów lizynowych stosowano albo komercyjny związek Boc-Lys(Cbz)-OH, bądź pochodną otrzymywaną na drodze selektywnego

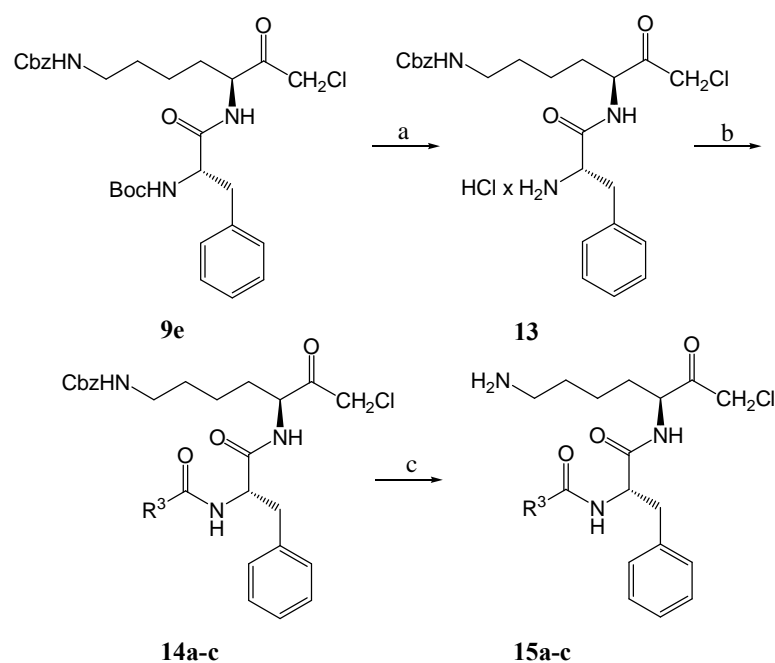
blokowania grupy N_ϵ -aminowej w handlowej *L*-lizynie. Wykorzystano tutaj metodę polegającą na kompleksowaniu grupy karboksylowej i N_α aminowej jonami miedzi przy takiej wartości pH, przy której grupa N_ϵ -aminowa pozostaje wolna.²⁰⁹ Tą ostatnią acyluje się chloromrówczanem benzylu w obecności NaOH, a następnie kompleks miedzi rozkłada się roztworem kwasu solnego i wolne jony Cu^{2+} strąca się jonami siarczkowymi. Zablokowany aminokwas *L*-Lys(Cbz)OH wydziela się przez zubożenie odfiltrowanego roztworu.



Schemat 3.1: Synteza dipeptydowych chlorometyloketonów, pochodnych lizyny i argininy. R^2 w pochodnych **11a-f** i **12a-e** = P2. Warunki i reagenty: a) chloromrówczan izobutyłu, Et_3N ; b) diazometan; c, d) HCl/MeOH ; e) $\text{R}^2\text{C}(\text{O})\text{Cl}$ lub $\text{R}^2\text{C}(\text{O})\text{OC}(\text{O})-i\text{-Bu}$, Et_3N ; f/g) TFA, anizol (pochodne lizyny) lub TFA, tioanizol (pochodne argininy).

Sposób syntezy dipeptydowych chlorometyloketonów przedstawiono na schemacie 3.1. Substraty z wolną grupą karboksylową (**1,2**) przeprowadzano w mieszanym bezwodniku w reakcji z chloromrówczanem izobutyłu. Produkty tej przemiany traktowano generowanym z diazaldu i destylowanym z eterowego roztworu diazometanem otrzymując odpowiednie diazometyloketony (**3,4**) z dobrymi wydajnościami. Te ostatnie przekształcano w chlorometyloketony (**5,6**) stosując 1 ekwiwalent chlorowodoru w postaci metanolowego roztworu HCl . Selektywne odblokowanie ugrupowania N_α -aminowego przy pomocy albo TFA albo 4-6 M roztworu HCl w metanolu i następujące po nim acylowanie metodą mieszanych bezwodników lub przy użyciu odpowiedniego chlorku kwasowego prowadziło do otrzymania analogów dipeptydowych.

Pochodne tripeptydowe (**15a-c**) zsyntezowano na bazie chlorometyloketonów Arg i Lys w sekwencji dwóch następujących po sobie reakcji acylacji metodą mieszanych bezwodników. Mieszany bezwodnik zastosowany w pierwszej z nich przygotowano z pochodnej Boc-*N*_α-Phe-OH w reakcji z chloromrówczanem izobutyłu. Otrzymany dipeptyd oczyszczono chromatograficznie i zrekrytalizowano. Następnie, w etapie poprzedzającym kolejną acylację, z jego *N*-końca usunięto grupę ochronną Boc (schemat 3.2).



Schemat 3.2: Przyłączanie podstawnika P₃ do dipeptydu Phe-Lys-CH₂Cl. Warunki i reagenty: a) HCl/MeOH, b) Et₃N, R³C(O)O(O)C-*i*-Bu, c) 10% anizol w TFA. R³ w **14a** to reszta BocPhe, a w **15a** odblokowana reszta Phe.

Chlorometyloketon homoargininy otrzymano przekształcając Boc-HN-hArg(Cbz)₂-OH zgodnie z procedurą opisaną dla lizyny i argininy. Homoargininę otrzymuje się poprzez guanidynowanie Boc-HN-Lys-OH przy pomocy *N,N*-dibenzylloksykarbonylo-*S*-metyloizotiomocznika. Reakcję tą poprzedza hydrogenolityczne usunięcie grupy ochronnej Cbz z atomu *N*_ε łańcucha bocznego reszty lizyny.

Wszystkie końcowe produkty oczyszczano przy pomocy chromatografii kolumnowej i otrzymywano w postaci krystalicznej po rekrystalizacji czystych frakcji z układu heksan/octan etylu.

Procedura otrzymywania chlorometyloketonów zastosowana dla potrzeb tej rozprawy obciążona jest pewnym ryzykiem, ze względu na toksyczne i wybuchowe właściwości stosowanego w tym celu diazometanu. Właśnie ze względu na koszty oraz

bezpieczeństwo nie ma ona zastosowania przy większej skali procesu. Zaletą tej metody w skali laboratoryjnej jest natomiast wysoka wydajność, pod warunkiem zachowania reżimu całkowicie bezwodnych warunków na etapie otrzymywania mieszanego bezwodnika i przekształcania go w diazozwiązek. Należy w tym miejscu podkreślić, że wiele grup funkcyjnych dobrze toleruje diazometan, co umożliwia jego stosowanie przy otrzymywaniu bardziej wyrafinowanych pochodnych zarówno peptydowych jak i niepeptydowych.^{210,211} Literatura podaje alternatywne metody otrzymywania halometryloketonów, które opracowywano chcąc przygotować tańszy i bezpieczniejszy proces wytwarzania tej klasy związków cieszącej się dużym zainteresowaniem przemysłu farmaceutycznego z powodu ich właściwości biologicznych, a także z uwagi na możliwość ich zastosowania jako prekursorów bardziej złożonych pochodnych.²¹² Pierwsza koncepcja opierała się na zachęcających wynikach prac Villieras'a i współpracowników, którzy z powodzeniem przeprowadzili bezpośrednie przekształcenie estru aminokwasu w bromometryloketon.²¹³ Podstawowym reagentem używanym w tej procedurze jest generowany *in situ* w obecności α -aminoestru bromometrylolit. Rozważania mechanistyczne nad przebiegiem tej reakcji doprowadziły do opracowania jej różnych modyfikacji, w tym procedury z użyciem aminoestru, chlorojodometanu i LDA, które reagując dawały przejściowy tetraedryczny produkt przekształcany następnie z dobrą lub bardzo dobrą wydajnością w chlorometryloketony w etanolu w obecności kwasu.²¹⁴ Ograniczeniem tej metody, szczególnie w skali przemysłowej jest powstawanie jako produktu ubocznego trującego i wysokowrzącego chlorodijodometanu. Sprawdza się ona natomiast w sytuacji, kiedy docelowym związkiem ma być nie chlorometryloketon, ale jego pochodna epoksydowa. Wówczas tworzący się w opisanych wyżej warunkach chlorometryloketon i chlorodijodometan są redukowane nadmiarem borowodorku sodu. Powstająca z chlorometryloketonu chlorohydryna pod wpływem KOH w etanolu przekształcana jest następnie w odpowiedni epoksyd. Według tej procedury w Bristol-Myers Squibb prowadzi się syntezę epoksydów w skali kilogramowej. Problem izolacji chlorometryloketonu z mieszaniny zawierającej ClCH_2 rozwiązaali naukowcy z Pfizer'a modyfikując procedurę opracowaną przez Bristol-Myers Squibb. Po pierwsze zmniejszyli oni ilość użytego chloriodometanu, a dodatkowo wprowadzili kolejny reagent, butylolit, który reagując z tetraedrycznym produktem przejściowym powodował szybką wymianę atomu chlorowca i metalu, dając w rezultacie znacznie lotniejszy jodek butylu, jako główny produkt uboczny oraz enolan. Acydoliza mieszaniny reakcyjnej prowadziła do

odpowiedniego chlorometyloketonu. Należy dodać, że reakcja przebiega stereospecyficznie, a końcowa wydajność otrzymywania epoksydów z uzyskiwanych w oparciu o tą procedurę chlorometyloketonów jest wyższa niż w procedurze z Bristol-Myers Squibb.²¹⁵

Używanie reagentów typu halometylolitu na większą skalę również nie jest najlepszym rozwiązaniem z punktu widzenia bezpieczeństwa. Bristol-Myers Squibb zaproponowali kolejne rozwiązanie, które scharakteryzowali jako „metodę bezpieczniejszą od tych z użyciem diazometanu lub reagentów typu halomemetylolitu”.²¹⁶ Ich propozycja zakładała przekształcenie estru α -aminokwasu w odpowiedni chlorometyloketon przy użyciu generowanego *in situ* ylidu siarkowego z chlorku trimetylosulfoksoniowego i *tert*-butanolanu potasu. Przeprowadzana w kolejnym etapie reakcja ylidu i estru prowadzi do β -ketoylidu siarkowego, który poddaje się acydolizie HCl generowanym z kwasu metanosulfonowego i LiCl. Użycie w tej metodzie estrów 4-nitrofenylowych w miejsce metylowych zabezpiecza przed ewentualną racemizacją produktu.

W niniejszej pracy wykorzystano procedurę z diazometanem kierując się zadowalającymi wynikami wstępnych prób syntezy. Testowanie uzyskanych produktów jako inhibitorów gingipain wymagało odblokowania zabezpieczonych grup aminowych. Najłagodniejszą z opisywanych w literaturze metod usuwania ugrupowania benzyloksykarbonylowego z reszt aminowych jest katalityczna hydrogenacja. Niestety nie ma ona zastosowania dla pochodnych posiadających ugrupowanie halometyloketonowe, które w tych warunkach łatwo redukują się do metyloketonów. Alternatywną metodą jest zastosowanie bromowodoru w kwasie octowym. Niemniej, ilość produktów ubocznych powstających w czasie odblokowania nie zachęcała do wyboru tej drogi. Zadowalające wyniki dla pochodnych lizyny uzyskano stosując mieszaninę 10% anizol/TFA. W przypadku pochodnych argininowych przetestowano także mieszaninę 10% tioanizol/TFA, która zazwyczaj dawała lepsze rezultaty. Mankamentem tej metody okazała się znaczna ilość pochodnej tioanizolu w mieszaninie poreakcyjnej. Pierwszy etap zastosowanej dla związków **9a-e** oraz **15a-c** procedury polegał na rozpuszczeniu zablokowanej pochodnej w przygotowanym roztworze i mieszaniu w temperaturze pokojowej, co najmniej 24 godziny. W kolejnym, z surowej mieszaniny odparowywano TFA, a pozostałość traktowano mieszaniną eteru i wody dejonizowanej. Warstwy rozdzielano i wodną kilkakrotnie przemywano eterem. Następnym etapem była izolacja produktu z warstwy wodnej metodą wysokosprawnej

chromatografii cieczowej na odwróconej fazie. W przypadku związków Arg (**10a-e**) do fazy wodnej przechodziła także pochodna tioanizolu, której udział w rozdzielanej mieszaninie, czas retencji zbliżony do czasów rejestrowanych dla właściwych produktów oraz wysoka absorbancja przy zastosowanych długościach fali lamp detektora bardzo utrudniały separację. Czystość otrzymanych produktów potwierdzano w dodatkowych eksperymentach z zastosowaniem analitycznej wysokosprawnej chromatografii cieczowej, analizując próbki w dwóch różnych gradientach. Otrzymane preparaty liofilizowano i przechowywano w $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odrębnego postępowania, ze względu na bardzo niskie wydajności odblokowania metodą tioanizol/TFA wymagały dwie pochodne – chlorometyloketony argininy i homoargininy. Do odblokowania tych związków zastosowano procedurę ze skroplonym HF^* . Niestety, izolacja pożądaných produktów metodą HPLC na odwróconej fazie w tym przypadku nie powiodła się.

3.2.2 Analiza oddziaływań chlorometyloketonów z RgpB

Ocena własności inhibitorowych zaprojektowanych związków polegała na pomiarze^{**} zaniku resztkowej aktywności enzymu w ich obecności, w warunkach reakcji pierwszorzędowej, osiąganych poprzez zastosowanie dużego nadmiaru inhibitora względem proteazy.

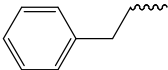
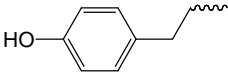
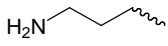
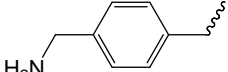
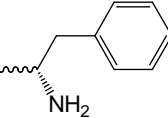
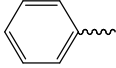
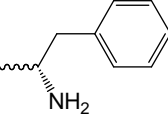
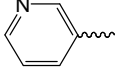
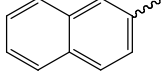
Wszystkie testowane dipeptydowe chlorometyloketony argininy okazały się skutecznymi nieodwracalnymi inhibitorami RgpB z wartościami $k_{\text{obs}}/[\text{I}]$ mieszczącymi się w zakresie $10^6 - 10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabela 3.1). Wyniki te pozwalają stwierdzić, że ligandy o budowie $\text{R}^2\text{-Arg-CH}_2\text{Cl}$ są wystarczająco rozbudowane, by zapewnić optymalne oddziaływanie z miejscem aktywnym enzymu. Ich szczegółowa analiza prowadzi do kolejnego ogólnego wniosku – obecność lub brak w cząsteczkach inhibitorów *N*-końcowej grupy α -aminowej nie wpływa na ich wiązanie do cząsteczki enzymu. Zgodnie z wynikającym ze struktury krystalicznej kompleksu D-Phe-Phe-Arg- CH_2Cl i RgpB sposobem oddziaływania obu jego składników, ta grupa nie jest zaangażowana w jakiegokolwiek oddziaływanie z białkiem. W istocie, wartość $k_{\text{obs}}/[\text{I}]$ uzyskana dla pochodnej **12e** ($1,24 \times 10^6\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) jest bardzo bliska wartości tego parametru

* Próby odblokowania grup aminowych w pochodnych $\text{Arg}(\text{Z})_2\text{-CH}_2\text{Cl}$ oraz $\text{hArg}(\text{Z})_2\text{-CH}_2\text{Cl}$ przeprowadzono w Zakładzie Chemii Peptydów na Uniwersytecie Warszawskim za zgodą prof. J. Izdebskiego.

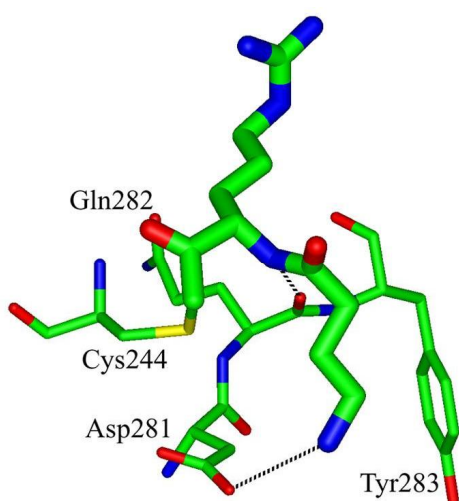
** Pomiar zaniku resztkowej aktywności gingipain w obecności zsyntezowanych inhibitorów przeprowadził dr hab. Daniel Krowarsch z Zakładu Inżynierii Białka na Uniwersytecie Wrocławskim.

otrzymanej dla pochodnej **12a** ($1,26 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), która pod względem struktury różni się od tej pierwszej jedynie brakiem *N*-końcowej grupy α -aminowej. Dużą zmianę w kinetyce inhibicji RgpB otrzymanymi związkami wywołuje wprowadzenie do cząsteczki liganda polarnej grupy funkcyjnej w podstawniku P2.

Tabela 3.1: Aktywność otrzymanych peptydowych chlorometyloketonów względem gingipain

	Gingipaina R2 R ² C(O)-Arg-CH ₂ Cl		R ₆	Gingipaina K R ² C(O)-Lys-CH ₂ Cl		
	<i>k</i> _{obs} [s ⁻¹]	<i>k</i> _{obs} /[I] [mol ⁻¹ s ⁻¹]		<i>k</i> _{obs} [s ⁻¹]	<i>k</i> _{obs} /[I] [mol ⁻¹ s ⁻¹]	
12a	0,00298 ±0,00021	1260000 ±152000		11a	0,0431 ±0,0045	4460000 ±690000
12b	0,05878 ±0,003	25100000 ±2540000		11b	0,0554 ±0,002	848000 ±732000
12c	0,07858 ±0,0109	33200000 ±6270000		11c	0,0572 ±0,0112	1060 ±272
12d	0,04055 ±0,0061	16900000 ±3390000		11d	0,00095 ±0,00021	132 ±35,7
12e	0,00283 ±0,00029	1240000 ±189000		11e	0,00481 ±0,001	115 ±29,8
				11f	0,1020 ±0,0115	11500000 ±1880000
			Gingipaina K R ³ C(O)-Phe-Lys-CH ₂ Cl			
				15a	0,0108 ±0,0023	279 ±73,2
				15b	0,0112 ±0,00113	105000 ±17600
				15c	0,0151 ±0,0017	267000 ±43400

Obserwowany wzrost powinowactwa inhibitorów **12b-12d** do RgpB 10-30 razy względem pochodnej **12a**, zawierającej w pozycji P2 resztę fenyloetylową, wyraźnie wskazuje na duży udział różniących je grup polarnych w kształtowaniu oddziaływań z resztami aminokwasów budujących wnękę S2 enzymu. Najskuteczniejszym w tej grupie okazał się związek **12c** ($k_{\text{obs}}/[\text{I}] = 3,32 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), który, zgodnie ze stosowanym w analizie modelem oddziaływań, może utworzyć mostek solny z ugrupowaniem karboksylowym reszty Asp281 poprzez dodatnio naładowaną grupę aminową łańcucha bocznego podstawnika P2 (rysunek 3.4). Dodatkowo na szybkość inhibicji RgpB tą pochodną wpływają prawdopodobnie hydrofobowe oddziaływania łańcucha bocznego P2 z resztami wnęki S2. Zamiana reszty fenyloetylowej w pozycji P2 na (*p*-hydroksyfenylo)etylową (**12b**) również poprawia parametry kinetyki wiązania inhibitora. Osiągana w tym przypadku wartość $k_{\text{obs}}/[\text{I}] = 2,51 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ jest prawdopodobnie rezultatem tworzącego się wiązania wodorowego między grupą hydroksylową podstawnika P2 a resztą karboksylową Asp281, które uzupełnia obserwowane dla pochodnej **12a** oddziaływania hydrofobowe wynikające z przestrzennej bliskości pierścieni benzenowych reszty Tyr283 enzymu i podstawnika P2 liganda. Wyjaśnienie podobne do prezentowanych powyżej można przytoczyć dla wyniku uzyskanego z udziałem pochodnej **12d** ($k_{\text{obs}}/[\text{I}] = 1,69 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), zawierającej w pozycji P2 resztę (*p*-aminometylo)benzylową, której budowa wskazuje na możliwość realizowania analogicznego schematu oddziaływań z wnękami wiążącymi RgpB.



Rysunek 3.4: Sposób wiązania inhibitora **12c** w centrum aktywnym RgpB. Wyeksponowano oddziaływania we wnęcie S2.

Konkludując, można stwierdzić, że w pozycji P2 projektowanych inhibitorów gingipainy R2 powinno się umieszczać reszty posiadające jednocześnie fragment hydrofobowy oraz ugrupowanie polarne, ze wskazaniem na dodatnio naładowane, które może służyć jako donor wiązania wodorowego. Brak odpowiedniej grupy funkcyjnej uniemożliwia oddziaływanie z resztą Asp281, co obniża powinowactwo inhibitora do proteazy o ponad 1 rząd wielkości.

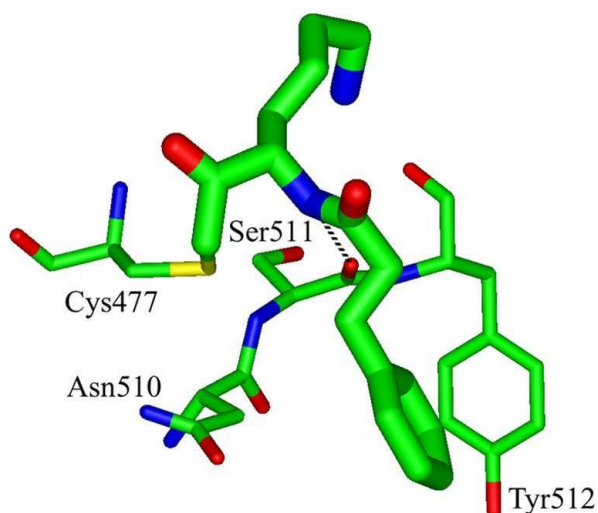
3.2.3 Analiza oddziaływań inhibitorów z Kgp

Zsyntezowane dipeptydowe chlorometyloketony zaprojektowane jako specyficzne inhibitory Kgp okazały się mniej aktywne w porównaniu do ich analogów argininowych testowanych jako inaktywatory RgpB. Opierając się na wstępnym modelu Kgp można było zakładać wyraźne podobieństwo wnęk S2 obu badanych gingipain, co zadecydowało o wyborze tych samych podstawników P2 dla obu grup inhibitorów. Uzyskane wyniki testów enzymatycznych wykazały jednak kluczowe znaczenie różnic strukturalnych odpowiedzialnych za odmienne preferencje substratowe obu enzymów nie tylko w obrębie kieszeni S1, ale także we wnękach S2. Najistotniejsza jest tutaj zamiana odpowiadających sobie reszt Asp281 o charakterze kwasowym w RgpB na obojętną resztę Asn510 w kieszeni S2 Kgp. Zgodnie z pierwotnymi założeniami, atom tlenu ugrupowania amidowego Asn510 miał pełnić podobną rolę, jak atomy tlenu grupy karboksylowej Asp281. Szczegółowa analiza międzycząsteczkowych oddziaływań w Kgp dyskwalifikuje te założenia. Okazuje się, że orientacja łańcucha bocznego Asn510 w Kgp uniemożliwia jego oddziaływanie poprzez karbonyłowy atom tlenu z heteroatomami łańcucha bocznego wiązanego liganda, najprawdopodobniej tworzy się wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe z ugrupowaniem amidowym łańcucha głównego enzymu. W tej sytuacji przede wszystkim grupa aminowa łańcucha bocznego Asn510 ma szansę kontaktować się z inhibitorem, co diametralnie zmienia własności wnęki S2 w Kgp w porównaniu do odpowiedniej kieszeni RgpB.

Najsukuteczniejszymi inhibitorami Kgp okazały się pochodne zawierające w pozycji P2 reszty hydrofobowe. Zaskakująco, najlepszy parametr $k_{\text{obs}}/[I] = 1,15 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ uzyskano dla modelowej cząsteczki **11f**, którą zsyntezowano w trakcie wstępnych prac nad optymalizacją ścieżki syntetycznej i początkowo nie planowano stosować jako inhibitora. Wbudowanie do tej cząsteczki reszty benzoilowej w pozycji P2 zwiększyło jej powinowactwo do gingipainy K 220 razy względem testowanego dla porównania

chlorometyloketonu lizyny bez podstawnika na atomie N_α ($k_{\text{obs}}/[\text{I}] = 5,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ugrupowanie karbonylowe podstawnika ze względów geometrycznych nie ma możliwości tworzenia wiązania wodorowego z żadną z reszt wnęki S2. Z tego względu różnica w reaktywności pochodnych **11f** i **11a** wynika prawdopodobnie z mniej korzystnej orientacji hydrofobowych fragmentów podstawnika P2 inhibitora **11a**, co przekłada się na obniżenie jego aktywności względem Kgp w porównaniu do związku **11f**. W jego przypadku najistotniejsze są kontakty pierścienia aromatycznego reszty P2 liganda z hydrofobowymi fragmentami łańcucha bocznego Asn510 oraz łańcucha głównego fragmentu 510-512.

W założeniach podstawnik fenyloetylowy (związek **11a**), jako dłuższy, miał zwiększyć ilość kontaktów hydrofobowych liganda z resztami budującymi wnękę S2 (rysunek 3.5).



Rysunek 3.5: Sposób wiązania inhibitora **11a** w centrum aktywnym Kgp. Wyeksponowano oddziaływanie pierścieni aromatycznych reszty P2 i reszty Tyr512 enzymu.

Uzyskany wynik $k_{\text{obs}}/[\text{I}] = 4,46 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ świadczy jednak o obniżeniu powinowactwa tego inhibitora do Kgp w porównaniu do pochodnej benzoilowej. Efekt ten może być wywołany zwiększeniem elastyczności podstawnika P2, co skutkuje zwiększeniem liczby możliwości jego orientacji w przestrzeni, a tym samym gorszym wypadkowym dopasowaniem do wnęki S2.

Pierwotnie, w procesie modelowania molekularnego postulowano taką orientację bocznego łańcucha reszty Asn510, dzięki której mógłby on poprzez karbonylowy atom tlenu oddziaływać jako akceptor wiązania wodorowego z odpowiednimi grupami funkcyjnymi łańcuchów bocznych podstawników P2 wiązanych ligandów. Z tego względu obsadzenie pozycji P2 inhibitora przez resztę *p*-hydroksyfenyloetylową

wydawało się optymalnym rozwiązaniem. Wyliczony dla związku **11b** parametr $k_{obs}/[I]$ jest, co prawda, 16 razy większy w porównaniu do uzyskanego dla LysCH₂Cl, ale nadal ma wartość pięciokrotnie niższą od otrzymanej dla **11a**. Wynika z tego, że grupa hydroksylowa reszty P2 nie uczestniczy w tworzeniu sieci oddziaływań enzym-inhibitor. Potwierdzałoby to dodatkowo tezę o niekorzystnej dla formowania wiązania wodorowego orientacji przestrzennej reszty Asn510, która do wnęki S2 przypuszczalnie eksponuje grupę -NH₂. Przy sprzyjającej geometrii cząsteczki inhibitora mogłaby ona pełnić rolę donora wiązania wodorowego dla ugrupowania hydroksylowego liganda. Niemniej otrzymany wynik kinetyki wiązania pochodnej **11b** do Kgp wyklucza takie oddziaływanie. Dyskryminowanie obecności grupy o funkcji donora wiązania wodorowego w łańcuchu bocznym podstawnika P2 wydaje się być jednym z elementów specyficzności Kgp. Stwierdzenie to znajduje uzasadnienie w zaobserwowanej preferencji miejsca hydrolizowanego przez enzym w substratach takich jak ludzkie histatyny. Hydroliza cząsteczki substratu następuje raczej za sekwencją Glu-Lys niż za Tyr-Lys.¹⁹⁹

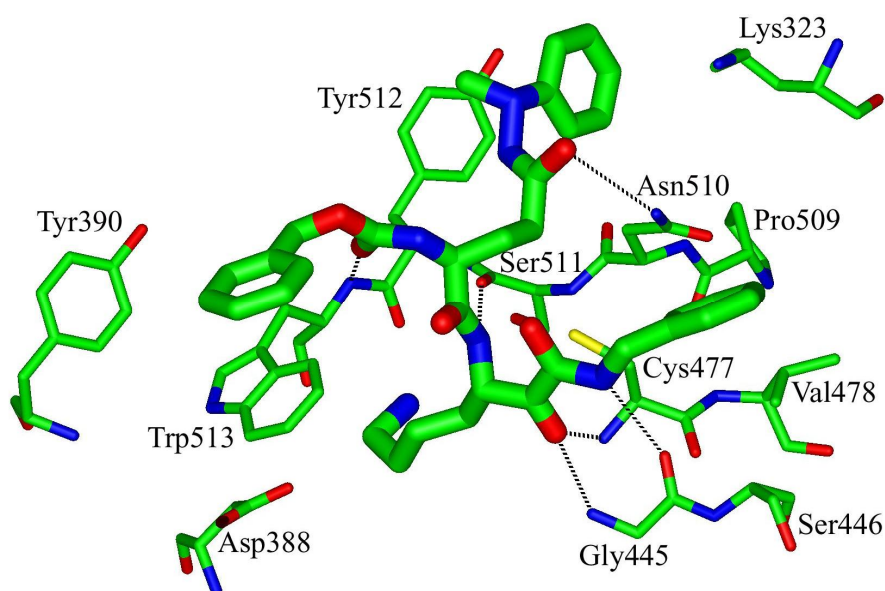
Wyniki zupełnie niekorespondujące z założeniami uzyskuje się dla związków z obdarzoną dodatnim ładunkiem grupą amoniową w strukturze podstawnika P2 (**11c** i **11d**). Podobnie dzieje się też w przypadku pochodnych z wolną *N*-końcową grupą NH₂ (**11e**, **15a**). Szybkość inhibicji Kgp w obecności tych cząsteczek jest co najmniej 50 razy mniejsza w porównaniu do obserwowanej w eksperymencie z Lys-CH₂Cl. Niskie powinowactwo inhibitorów **11c** i **11d** do Kgp można próbować wyjaśniać w oparciu o te same przesłanki, które przytoczono dla pochodnej **11b**. Zaskakująca jest natomiast sięgająca 4 rzędów różnica wartości parametrów $k_{obs}/[I]$ zmierzonych dla **11a** i **11e**. Bowiern trudno przy pomocy metod modelowania molekularnego wskazać powody, dla których ta para pochodnych miałyby zachowywać się inaczej niż analogiczne inhibitory RgpB (**12a** i **12e**), które praktycznie nie różniły się między sobą pod względem szybkości hamowania enzymu. Zainteresowanie budzą również niska aktywność i odchylenie od liniowego przebiegu wykresu zależności $-\ln(v/v_0)$ od czasu, zaobserwowane w przypadku pomiarów wykonanych dla związków **11c-e** oraz **15a**. Wyróżniającą je cechą wspólną jest obecna w ich strukturze dodatnio naładowana grupa amoniowa. Zgodnie z przyjętym modelem oddziaływań ligand-Kgp, powinna ona wystawać do roztworu i podobnie jak amidowa grupa łańcucha głównego w pozycji P2 oraz *N*-końcowa grupa w pozycji P3 w FFR-CH₂Cl w RgpB nie wpływać na wiązanie cząsteczki inhibitora przez enzym. Przy takich założeniach trudno znaleźć molekularne

podstawy znacząco obniżonej aktywności w omawianej grupie związków. Nietypowa kinetyka wiązania jej przedstawicieli do Kgp wskazuje jednak na możliwość ich niespecyficznego wiązania wynikającego z oddziaływania poprzez dodatnio naładowane grupy amoniowe z resztami spoza miejsca aktywnego gingipainy K.

Odrębnego omówienia wymaga seria trzech tripeptydowych ligandów (**15a-c**) Kgp. W odróżnieniu od RgpB, wnęka S3 w Kgp wydawała się wystarczająco głęboka, by zaprojektować cząsteczki rozbudowane o różne reszty P3 zwiększające ich specyficzność i powinowactwo do enzymu. Do zbadania charakteru tej kieszeni wiążącej posłużyły trzy analogi (**15a-c**) wyselekcjonowane do syntezy. Okazuje się, że dołączenie trzeciego podstawnika do macierzystego dipeptydu **11e** zmniejsza powinowactwo powstającej w rezultacie cząsteczki do enzymu. Na podstawie wartości zebranych w tabeli 3.1 można oszacować spadek aktywności tripeptydowych pochodnych **15b** i **15c** odpowiednio 40 i 17 razy względem wyjściowego dipeptydu **11e**. W przypadku cząsteczki **15c** oczekiwano korzystnych oddziaływań hydrofobowej reszty 2-naftylowej z aromatycznymi pierścieniami Trp513 i Tyr390. Niewykluczone jednak, że przyjmuje ona niesprzyjającą orientację i wystaje do roztworu. Pirydyłowa reszta w **15b** obok oddziaływań hydrofobowych z Trp513 miała także uczestniczyć w tworzeniu wiązania wodorowego z grupą OH łańcucha bocznego Tyr390. Wyniki pomiarów kinetycznych nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, czy przewidywane oddziaływania mają miejsce. Hipotetycznie możliwa jest sytuacja, w której wynikający z nich zysk energetyczny zostaje wykorzystany do zniwelowania niekorzystnych efektów entropowych pojawiających się wskutek obecności w cząsteczce inhibitora „elastycznych” elementów łańcucha głównego dipeptydowego fragmentu P3-P2.

Przedstawiona powyżej analiza oddziaływań zsyntezowanych w ramach tej rozprawy inhibitorów z cząsteczką Kgp potwierdza poprawność przyjętego dla potrzeb ich projektowania modelu docelowego enzymu. Jego wiarygodności dowodzi również duża zgodność założeń dotyczących budowy wnęk wiążących z wynikami inhibicji uzyskanymi dla znanych syntetycznych inaktywatorów Kgp. Wspomagana komputerowo analiza przyjętego modelu 3D kompleksu gingipainy K z jednym z najbardziej aktywnych spośród opisanych dotychczas w literaturze inhibitorów tej proteazy ketopeptydu **139** (rysunek 1.21, rozdział 1.5.7.2, $K_i = 7,5 \times 10^{-11}$ M) sugeruje istnienie oddziaływań analogicznych do zaprezentowanych dla odpowiadających mu modeli opracowanych dla chlorometyloketonów serii **11** i **15** (Rysunek 3.6). Zachowane są w nim wszystkie obserwowane dla związków serii **11** i **15** wiązania wodorowe

współtworzone z odpowiednimi fragmentami w strukturze enzymu, a dodatkowo oddziaływania o takim charakterze pojawiają się w wyniku kontaktu z resztami Gly445 i Trp513. Aminowa grupa łańcucha bocznego reszty lizyny (P1) zaangażowana jest w tworzenie sieci oddziaływań odpowiadających modelowi z rysunku 3.3. Reszta P2 bardzo dobrze wpasowuje się we wnękę S2 tworząc między innymi wiązanie wodorowe z ugrupowaniem amidowym Asn510 oraz wykorzystując obecność odpowiednio usytuowanych hydrofobowych łańcuchów bocznych Tyr512, Asn510, Lys323 i Pro509 (Rysunek 3.6).



Rysunek 3.6 Sposób wiązania ketopeptydu **139** (rysunek 21, rozdział 1.5.7.2), najaktywniejszego z opublikowanych dotychczas inhibitorów Kgp, w centrum aktywnym gingipainy K.

Korzystne oddziaływania hydrofobowe dominują również przy wiązaniu P3 do najważniejszych reszt wnęki S3 – Trp513, Tyr390 i Asp388. Dodatkowe obserwacje wynikają z obecności w **139** reszty P1', nieobecnej w omówionych chlorometyloketonach. Jej orientacja w zgodzie z zakładanym modelem powinna umożliwiać tworzenie wiązania wodorowego z resztą Gly445, a także hydrofobowe oddziaływania z resztami Val478, Cys477 i Asn510.

Kolejnym zaczerpniętym z literatury przykładem potwierdzającym zgodność wyników symulacji oddziaływań enzym-inhibitor, otrzymanych dla zaproponowanego modelu Kgp, z uzyskiwanymi w pomiarach kinetycznych, prowadzonych z udziałem syntetycznych ligandów Kgp, jest pochodna **140** (rysunek 1.22, rozdział 1.5.7.2). Także

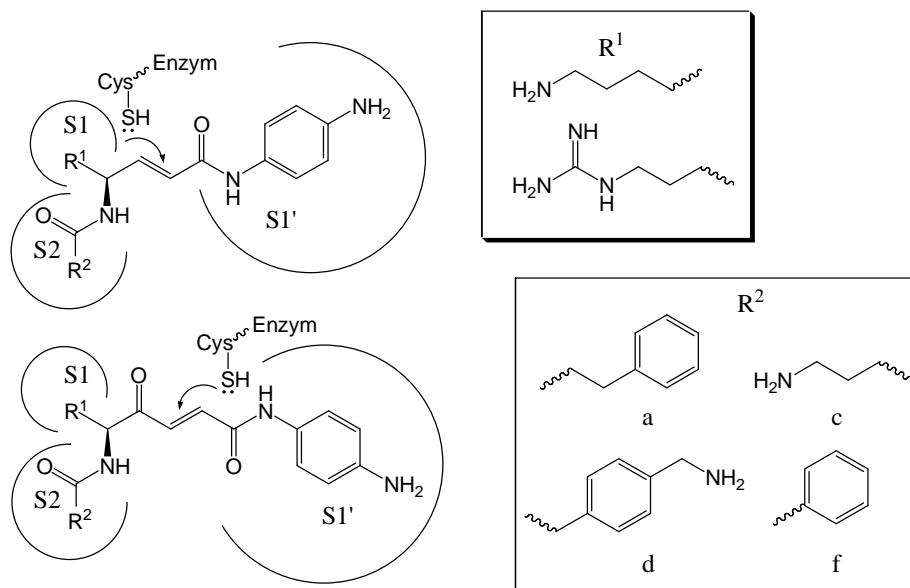
i w tym przypadku podstawą silnego oddziaływania z enzymem jest obecność reszty Lys w pozycji P1, hydrofobowego fragmentu P2, który może kontaktować się z Asn510 oraz podstawników P3 i P1' zaangażowanych w podobne oddziaływania, jak opisane dla inhibitora **139**.

O podstawowym znaczeniu obecności reszt hydrofobowych w pozycjach P2 i P3 dla powinowactwa inhibitorów do Kgp, co pozostaje w zgodzie z zaproponowanym modelem ich wzajemnego oddziaływania, świadczą doniesienia literaturowe dotyczące rezultatów testów kinetycznych przeprowadzanych na związkach zawierających takie fragmenty, w tym: akceptorach typu Michael'a ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CO-Lys-CH=CHCOOEt}$),²⁰² chlorometyloketonach i acyloksymetyloketonach ($\text{Cbz-Phe-Lys-CH}_2\text{Cl}$ i $\text{Cbz-Phe-Lys-CH}_2\text{OCO-2,4,6-Me}_3\text{Ph}$).¹⁷⁵

3.3 Akceptory typu Michael'a

3.3.1 Założenia, projektowanie

Wyniki badań kinetycznych z udziałem chlorometyloketonów oraz analiza sposobu ich wiązania we wnękach wiążących gingipain pozwoliły na wyselekcjonowanie podstawników P2 najkorzystniej oddziałujących z resztami budującymi centra aktywne tych enzymów. Wstępne badania służące określeniu specyficzności wnęk S2 i S3 enzymów miały pomóc w przygotowaniu mniej reaktywnych i bardziej selektywnych inhibitorów gingipain. Docelowo planowano otrzymanie inhibitorów epoksydowych, o których wiadomo, że są skutecznymi inaktywatorami proteaz cysteinowych. Przygotowując projekt syntezy postanowiono, że końcowe oksirany będą otrzymywane przez epoksydację odpowiednich prekursorów nienasyconych (rysunek 3.7) lub bromometyloketonów (schemat 3.27) zawierających w strukturze konserwatywne fragmenty P1 i P2 obecne w najbardziej aktywnych chlorometyloketonach (**11a**, **11d**, **11e**, **12a** **12d**, **12c**).



Rysunek 3.7: Zaprojektowane α,β -nienasycone oraz γ -okso- α,β -nienasycone amidy.

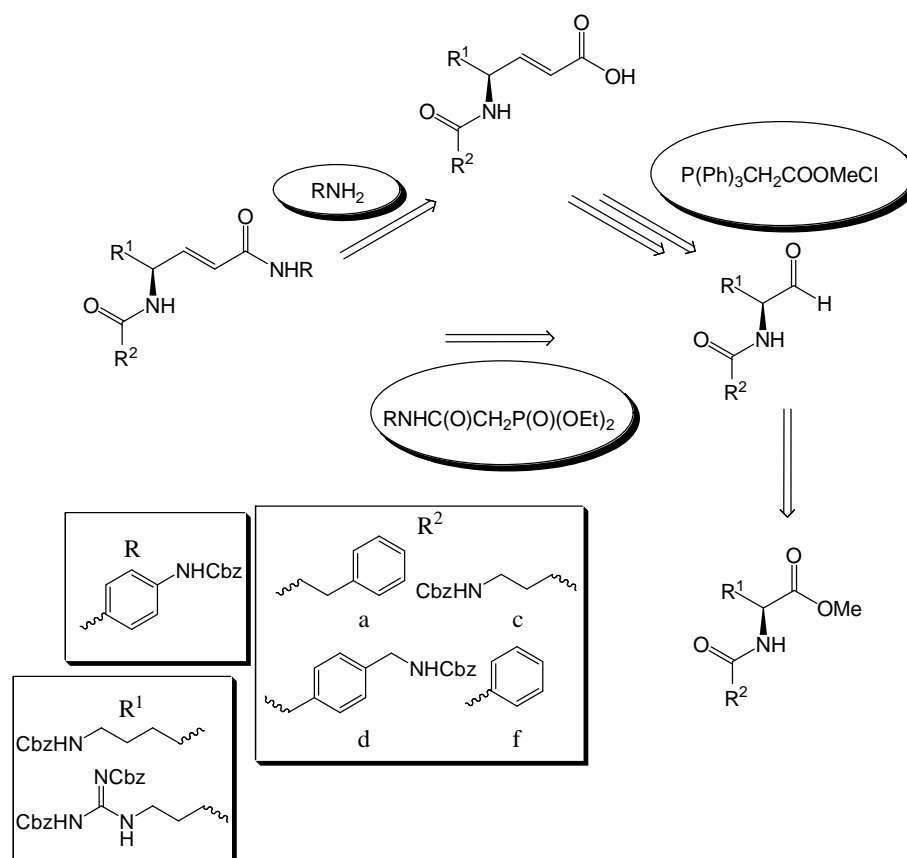
Wybór ścieżek syntetycznych z etapem otrzymywania pochodnych zawierających wiązanie C=C był uzasadniony możliwością wykorzystania tych związków do trzech celów. Pierwsze zastosowanie wynika z reaktywności wiązania C=C w reakcji addycji typu Michael'a z ugrupowaniem SH, co pozwoliło na ich użycie w roli inhibitorów

gingipain. Druga możliwość to, w przypadku pochodnych zawierających grupę karboksylową na C-końcu, derywatywacja tych związków prowadząca do optymalizacji oddziaływań z wnęką S1' enzymu. Trzecim wariantem jest epoksydacja tych pochodnych.

3.3.2 Pochodne α,β -nienasycone

3.3.2.1 Retrosynteza

Jednym z rozwiązań stosowanych powszechnie przy otrzymywaniu α,β -nienasyconych estrów (amidów) jest utworzenie wiązania C=C w reakcji aldehydu z odpowiednim ylidem generowanym przy pomocy zasady z soli fosfoniowej (reakcja Wittiga)²¹⁷ lub fosfonianu dietylowego (reakcja Hornera-Wadswortha-Emmonsa)^{218,219} (schemat 3.4).



Schemat 3.4: Retrosynteza pochodnych α,β -nienasyconych.

Ze względu na różne trudności towarzyszące przekształcaniu wybranych *N*-acylowanych estrów lizyny i argininy w aldehydy przetestowano trzy warianty ich syntezy: bezpośrednią redukcję estru do aldehydu,²²⁰ redukcję estru do alkoholu, który następnie utleniało^{221,222} i wreszcie redukcję amidu Weinreba²²³ otrzymywanego z kwasu uzyskiwanego poprzez hydrolizę wyjściowego *N*-acylowanego estru. Wprowadzenie do cząsteczki inhibitora fragmentu zawierającego wiązanie C=C zrealizowano dwoma sposobami. Pierwszy z nich opierał się na klasycznej reakcji Wittiga²¹⁷ i prowadził do pochodnej estrowej. Nienasycony ester poddawano hydrolizie i otrzymany kwas sprzęgano z resztą P1'. Drugi sposób omijał kłopotliwy, przebiegający z niską wydajnością, etap sprzęgania nienasyconego kwasu z aminowym prekursorem reszty P1' dzięki zastosowaniu zmodyfikowanego odczynnika do reakcji HWE. W miejsce popularnego fosfonooctanu trietylu użyto jego amidowy analog z wbudowanym fragmentem komplementarnym do wnęki S1' gingipain. Wybór tej strategii znacznie upraszczał procedurę syntetyczną, ponieważ układ C=C oraz reszta P1' były wprowadzane do docelowej cząsteczki w tej samej reakcji.

3.3.2.2 Synteza

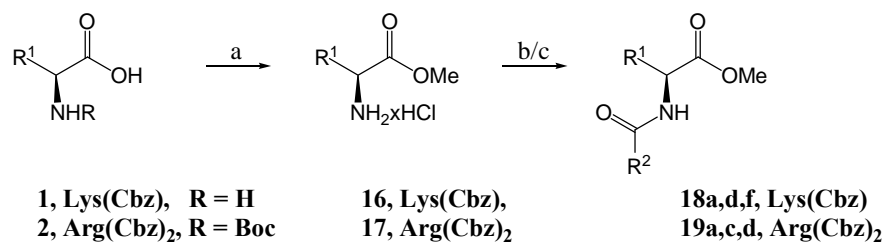
3.3.2.2.1 *N*-Acylowane estry lizyny i argininy

Podobnie jak dla halometryloketonów, wyjściowymi związkami w syntezie *N*-acylowanych estrów były Boc-Arg-(Cbz)₂-OH oraz H₂N-Lys-(Cbz)-OH otrzymywany z lizyny*. Substraty te najpierw przekształcano w estry metylowe (**16**, **17**) metodą z SOCl₂ w metanolu według standardowej procedury.²²⁴ Chlorowódz, którego powstawanie towarzyszy reakcji estryfikacji reaguje z grupą ochronną Boc w przypadku pochodnej argininowej lub jest wiązany przez wolną grupę aminową substratu lizynowego i w efekcie produkty izoluje się jako chlorowodorki estrów. Otrzymane sole estrów acylowano w warunkach zasadowych odpowiednimi chlorkami/mieszanymi bezwodnikami, zgodnie z procedurami przedstawionymi dla chlorometryloketonów.

Pochodne **18a** i **19a** otrzymano w reakcji z komercyjnym chlorkiem kwasu fenylopropionowego. Do syntezy analogu **18f** użyto handlowy chlorek benzoilu.

* Sposób selektywnego blokowania grupy aminowej łańcucha bocznego handlowej lizyny przedstawiono w podrozdziale 4.3.1.1.

W przypadku związków **18d** i **19d** zastosowano chlorek kwasu 4-(*N*-benzyloksykarbonyloaminometylo)fenylooctowego otrzymany w odrębnej kilkuetapowej syntezie z handlowego *p*-BrCH₂C₆H₄CH₂COOH. Ester **19c** uzyskano stosując mieszany bezwodnik wygenerowany z przygotowanego w odrębnej syntezie kwasu 4-*N*-Cbz-aminomasłowego.



Schemat 3.5: Synteza *N*-acylowanych estrów lizyny i argininy. Warunki i reagenty: a) SOCl₂, MeOH, 0°C-t.pok.; b) R²C(O)OC(O)-*i*-Bu, NMM lub R²C(O)Cl, NEt₃ THF bezwodny, 0°C. R² odpowiada reszcie P2. (W przypadku reszt zawierających końcową grupę aminową, są one zabezpieczone grupą ochronną Cbz).

3.3.2.2.2 Przekształcanie *N*-acylowanych estrów lizyny i argininy w aldehydowe prekursory α,β-nienasyconych amidów

3.3.2.2.2.1 Otrzymywanie *N*_ε-Cbz-*N*_α-fenylopropionylolizynalu

*N*_α-Acylowany ester **18a** przekształcano w aldehyd **22a** redukując go przy pomocy DIBAL-H. Zaletą tej metody jest możliwość bezpośredniej transformacji ugrupowania estrowego do aldehydowego (schemat 3.6, rozdział 3.3.2.2.2.2).

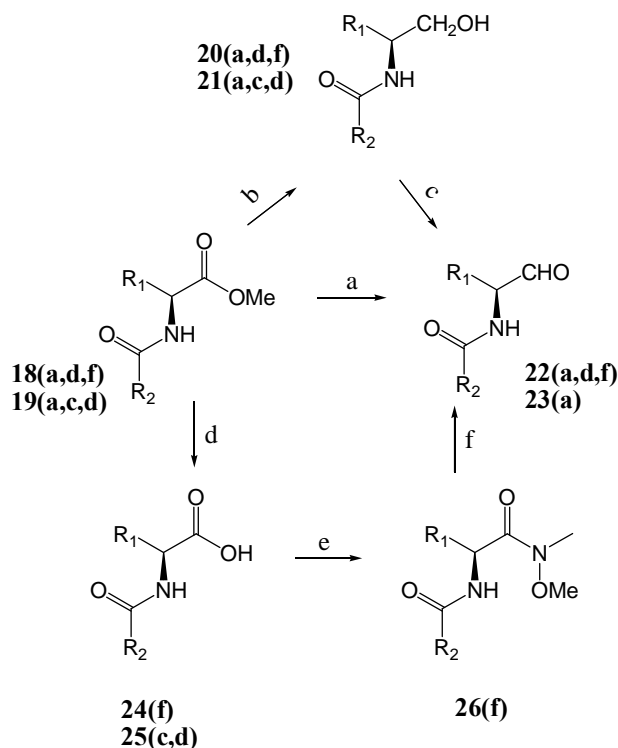
Niestety, zadowalającą, choć niską, wydajność tej reakcji uzyskiwano tylko w przypadku użycia świeżego odczynnika i z tego względu nie stosowano jej w syntezie pozostałych pochodnych aldehydowych.

3.3.2.2.2.2 Otrzymywanie pochodnych aldehydowych poprzez utlenienie odpowiednich alkoholi

Dla wybranych pochodnych znacznie lepsze rezultaty otrzymywania aldehydów dała procedura dwuetapowa. Najpierw *N*-acylowane estry zredukowano borowodorkiem sodu do alkoholi (**20a**, **20d**, **21a**, schemat 3.6), które utleniało następnie w reakcji Swerna do odpowiednich aldehydów (**22a**, **22d** i **23a**) z umiarkowaną bądź dobrą wydajnością, szacowaną na podstawie widma protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego. Otrzymywanie alkoholi z estrów **18d**, **18f** oraz **19d** przebiegało z dużymi

trudnościami. Utlenienie metodą Swerna, ani też kompleksem pirydyna \times SO₃ nie przyniosło oczekiwanego wyniku w przypadku alkoholu **21d**. Opisanymi metodami nie udało się również otrzymać aldehydu **22f**.

Schemat 3.6: Przetestowane metody syntezy aldehydowych prekursorów pochodnych nienasyconych. Warunki i reagenty: a) DIBAL-H, THF_{bezwodny}, -78°C; b) NaBH₄, LiCl, EtOH/THF 1:1, t. pok.; c) (COCl)₂/DMSO, Et₃N, -60°C; d) 2M NaOH; e) Et₃N, chlorowodorek *N,O*-dimetylohydroksyloaminy, BOP, THF_{bezwodny}, 0°C; f) LAH, THF_{bezwodny}, 0°C, następnie KHSO₄ aq.



Alkoholu **21c** nie otrzymano w postaci krystalicznej. Po reakcji redukcji estru **18c** mieszaninę przerobiono standardowo. Produkt wysuszony nad środkiem suszącym kilkakrotnie odparowano azeotropowo z absolutnym dichlorometanem i użyto w reakcji Swerna. Wynik tej ostatniej przemiany był niejednoznaczny i rutynowo stosowana metoda szacunkowego określenia wydajności przy pomocy spektroskopii ¹H NMR pozwoliła stwierdzić jedynie jakościowo obecność sygnału od protonu grupy aldehydowej.

3.3.2.2.2.3 Otrzymywanie pochodnych aldehydowych poprzez redukcję amidu Weinreba

Ester dipeptydu **19c** zhydrolizowano do kwasu **25c** w warunkach zasadowych, a następnie sprzęgano bez oczyszczania przy pomocy BOP z chlorowodorkiem *N,O*-dimetylohydroksyloaminy (schemat 3.6). Na podstawie widma ¹H NMR otrzymanego krystalicznego produktu stwierdzono, że w jego strukturze brakuje reszty

benzyloksykarbonylowej na atomie azotu reszty kwasu GABA. Nasunęło to podejrzenie, że grupa ochronna musiała ulec hydrolizie w czasie saponifikacji estru 2M NaOH. Przemawia za tym polarność produktu oceniona w chromatografii cienkowarstwowej. Podobny efekt zaobserwowano w eksperymencie opisywanym w podrozdziale 3.3.3.4.2, w którym ester **19c** traktowano karboanionem generowanym z metylofosfonianu dimetylu przy pomocy butylolitu. Również w tym przypadku na widmie ^1H NMR produktu zaobserwowano brak charakterystycznego sygnału przy $\delta \sim 5$ ppm pochodzącego od grupy PhCH_2O . Ponadto, integracja i przesunięcia sygnałów w obszarze aromatycznym odpowiadały jedynie dwóm resztom Cbz na atomach azotu ugrupowania guanidynowego. Bazując na tych wynikach zrezygnowano z próby testowania analogicznej ścieżki dla estru *tert*-butylowego. Zastosowanie pochodnej *tert*-butylowej pomogłoby rozwiązać problem wynikający z zasadowych warunków hydrolizy estru, ponieważ resztę *tert*-butylową można usunąć w warunkach kwaśnych zachowawczych dla reszty Cbz. Niemniej, konieczność użycia glinowodoru litu do redukcji amidu Weinreba w kolejnym etapie stwarza takie samo ryzyko utraty grupy ochronnej i ubocznych reakcji następczych. Nieoczekiwanie wysoka labilność ugrupowania karbaminianowego w warunkach zasadowych była już opisywana, chociaż przykładów tego typu w literaturze jest niewiele.²²⁵

Opisaną wyżej procedurę przekształcenia estru w amid Weinreba i jego redukcji do aldehydu udało się z powodzeniem zastosować dla pochodnej **18f**. Docelowy aldehyd **22f** otrzymano tym sposobem z wysoką wydajnością.

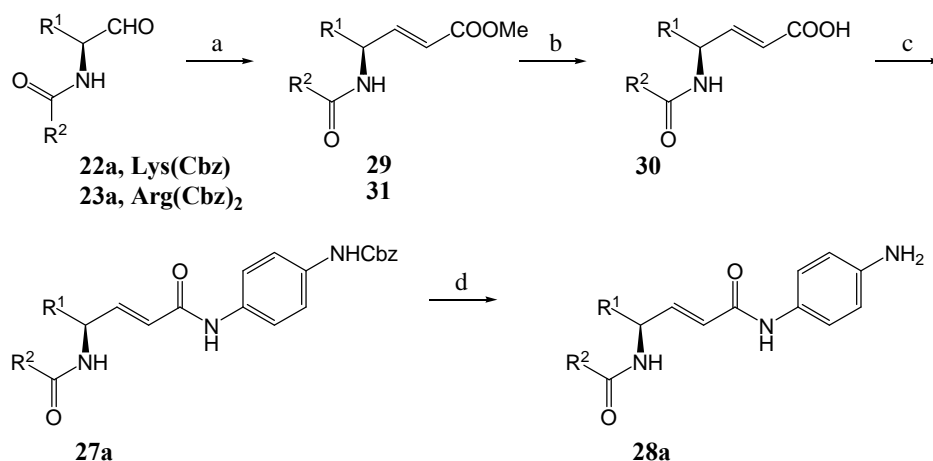
2.3.2.2.3 Otrzymywanie pochodnych α,β -nienasyconych z N_α -acylowanych Lys(Cbz)-H i Arg(Cbz)₂-H

Modelową pochodną **27a** i jej argininowy analog otrzymano na dwa sposoby. Pierwsza droga syntezy oparta o reakcję Wittiga zachodzącą między aldehydem **22a** i karboanionem generowanym przy pomocy *n*-BuLi z chlorku [(metoksykarbonylo)metylo]trifenylfosfoniowego prowadziła do α,β -nienasyconego estru **29a** (Schemat 3.7). W ten sam sposób otrzymano pochodną **31** z aldehydu **23a**.

Estry **29** i **31** hydrolizowano następnie w warunkach zasadowych. Nienasycony kwas (związek **30**) udało się otrzymać tylko w przypadku pochodnej lizynowej.

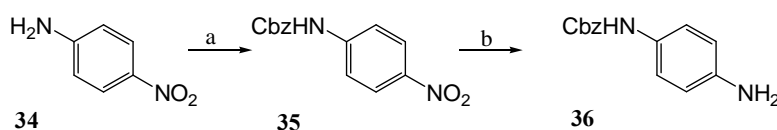
W kolejnym etapie sprzęgano go z przygotowaną w odrębnej reakcji 4-(*N*-benzyloksykarbonylo)fenylenodiaminą, zablokowanym prekursorem reszty P1', stosując HBTU (schemat 3.7).

4-(*N*-Benzyloksykarbonylo)fenylenodiaminę **36** otrzymywano w odrębnych reakcjach z 4-nitroaniliny lub fenylenodiaminy. W obu przypadkach w pierwszym etapie wyjściową aminę acylowano chloromrówczanem benzylu.



Schemat 3.7: Synteza α,β -nienasyconego amidu – pochodnej lizyny – z odpowiedniego nienasyconego kwasu. R¹ i R² jak na schemacie 3.4, do ostatniego etapu, w którym usuwa się reszty Cbz. Warunki i reagenty: a) Ph₃PCH₂COOMeCl, *n*-BuLi, THF, -78 °C; b) 2M NaOH/MeOH; c) Et₃N, HBTU, **36**, CH₃CN_{bezwodny}, t. pok.; d) 10% anizol w TFA t. pok.

Ze względu na niską wydajność obserwowaną dla drugiej pochodnej i kłopotliwą izolację końcowego produktu przy pomocy chromatografii kolumnowej, do przygotowywania tego fragmentu inhibitora zdecydowano się stosować pochodną nitrową **34** (schemat 3.8).



Schemat 3.8: Synteza *N*-Cbz-fenylenodiaminy. Warunki i reagenty: a) chloromrówczan benzylu, NaOH aq / dioksan; b) SnCl₂×2H₂O, AcOEt, ogrzewanie do wrzenia.

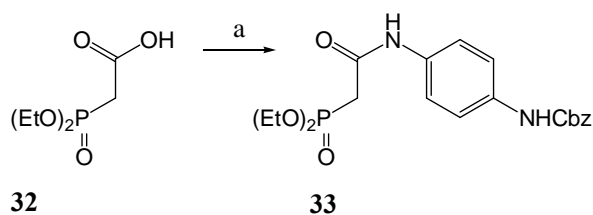
Acylowaną pochodną łatwo izoluje się poprzez krystalizację frakcyjną i ilościowo redukuje²²⁶ przy pomocy SnCl₂×2H₂O do 4-(*N*-benzyloksykarbonylo)fenylenodiaminy **36**.

Ostatni etap opisywanej ścieżki syntezy α,β -nienasyconego amidu **28a** – sprzęgnięcie nienasyconego kwasu **30a** z aminą **36** - przebiegał z niską wydajnością.

Przetestowano również alternatywną drogę syntezy nienasyconego kwasu, zaplanowaną w oparciu o rozwiązanie zaprezentowane w jednej z prac dotyczących olefinacji,²²⁷ które zakładało możliwość użycia jako czynnika nukleofilowego w HWE karboanionu wygenerowanego nie z fosfonoestru, a kwasu fosfonowego. Oryginalną procedurę zmodyfikowano i odpowiedni kwas przekształcano najpierw w ester trimetylosililowy w reakcji z chlorkiem trimetylosililowym. Produkt poddawano deprotonowaniu butylolitem i traktowano odpowiednim aldehydem w temperaturze poniżej -70°C . Mieszaninę reakcyjną powoli ogrzewano do temperatury pokojowej i dodawano do niej odpowiedni nadmiar wody celem zneutralizowania śladów butylolitu oraz zhydrolizowania estru sililowego. Widmo protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego z uzyskiwanej mieszaniny nie ujawniało obecności związku z nienasyconym wiązaniem C=C. Ponieważ obraz mieszaniny uzyskany techniką TLC wskazywał na wielokierunkowy przebieg przeprowadzonej reakcji, zrezygnowano z dokładniejszej analizy jej składu.

Skutecznym rozwiązaniem okazało się podejście polegające na przygotowaniu w niezależnym eksperymencie kompletnego czynnika nukleofilowego reakcji HWE, którego zastosowanie pozwala otrzymać końcowy α,β -nienasycony amid w jednym przejściu. Możliwość ta wynika z budowy używanego w tym celu amidu **33**, który po potraktowaniu zasadą, jako karboanion, tworzy wiązanie C=C atakując karbonyłowy atom węgla aldehydu, a jednocześnie wprowadza do struktury cząsteczki inhibitora zaprojektowany fragment amidowy P1'. Amid **33** otrzymano sprzęgając kwas **32** przy pomocy HBTU z aminą **36** (schemat 3.9).

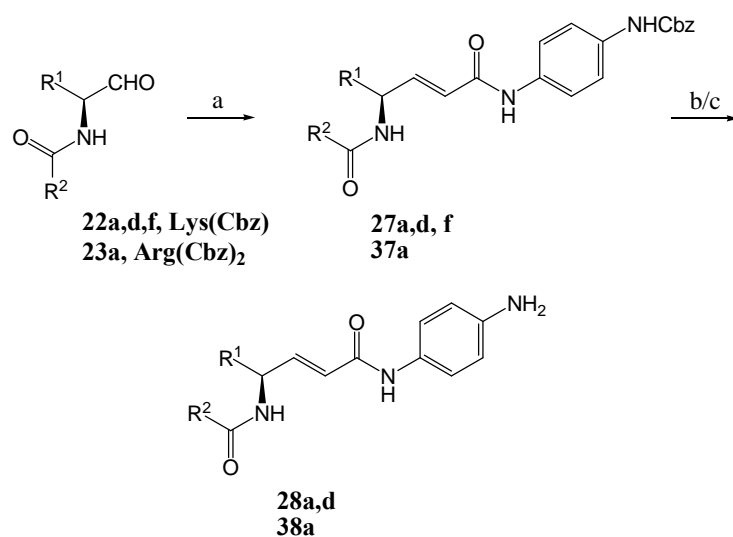
Schemat 3.9: Synteza odczynnika do reakcji HWE wykorzystywanego przy syntezie winyloamidów. Warunki i reagenty: a) **36**, HBTU, Et_3N ; THF, t. pok.



Pomimo że sprzężenie w tym przypadku przebiega z dobrą wydajnością, końcowy produkt **32** w czystej postaci izoluje się przy pomocy chromatografii kolumnowej i krystalizuje.

W celu zoptymalizowania warunków ostatniego etapu - reakcji HWE, przeprowadzono serię eksperymentów zmieniając rodzaj zasady używanej do generowania karboanionu, rozpuszczalnik oraz warunki fizyczne (temperatura,

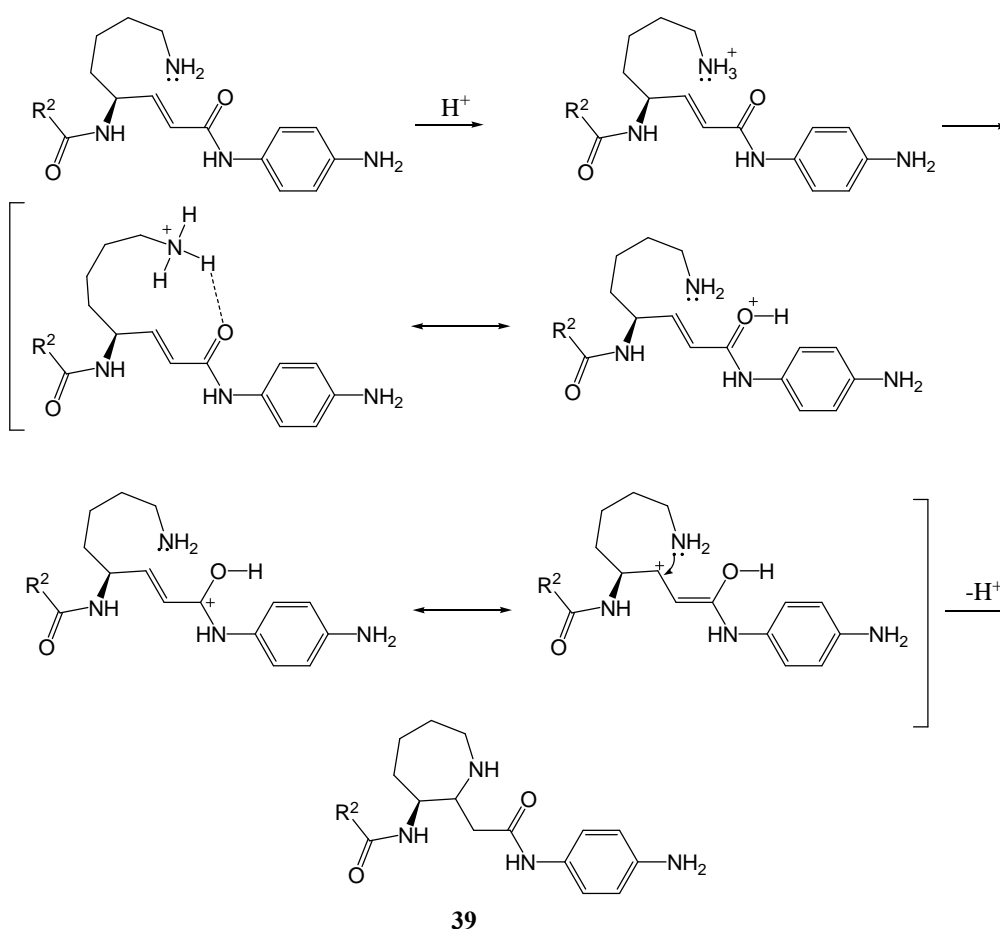
ultradźwięki). Próby z aktywowanym wodorotlenkiem baru, zarówno w warunkach podwyższonej temperatury (wrzący THF), jak i podczas traktowania mieszaniny reakcyjnej ultradźwiękami nie przyniosły pożądanych rezultatów. Ostatecznie zdecydowano się na wybór zasady organicznej, której użycie nie wymagałoby zachowania tak ścisłego reżimu temperatury oraz szczególnie trudnego w przypadku małej skali eksperymentu utrzymania całkowicie bezwodnego środowiska reakcji, jak w przypadku butylolitu czy wodoru sodu. Najbardziej adekwatna wydawała się tutaj wariacja Masamune'a-Roush'a reakcji HWE.²²⁸ Pozwala ona na zastosowanie dużo wygodniejszych w użyciu zasad organicznych (Et₃N, i-Pr₂NEt, DBU) dzięki zwiększeniu kwasowości protonu alfa fosfonianu poprzez dodanie nadmiaru LiCl. Próba z trójetyloaminą dała wynik negatywny. Natomiast bardzo zachęcające rezultaty osiągnięto stosując jako zasadę DBU (schemat 3.10). Po pierwsze, produkt otrzymano stosując tylko niewielki nadmiar reagenta fosforowego. Po drugie, krystaliczny produkt jest jedyną pochodną organiczną wypadającą z acetonitrylu użytego jako rozpuszczalnik. Z tego względu można go po reakcji odsączyć i po odmyciu soli nieorganicznych uzyskać względnie czysty α,β -nienasycony amid. Jedynym mankamentem pozostaje szacowana w przybliżeniu względem użytego aldehydu wydajność tego etapu. Z reguły sięga ona tylko około 30%. Powodzeniem zakończyły się próby otrzymania tą metodą pochodnych **27a**, **27d**, **27f** oraz **37a**.



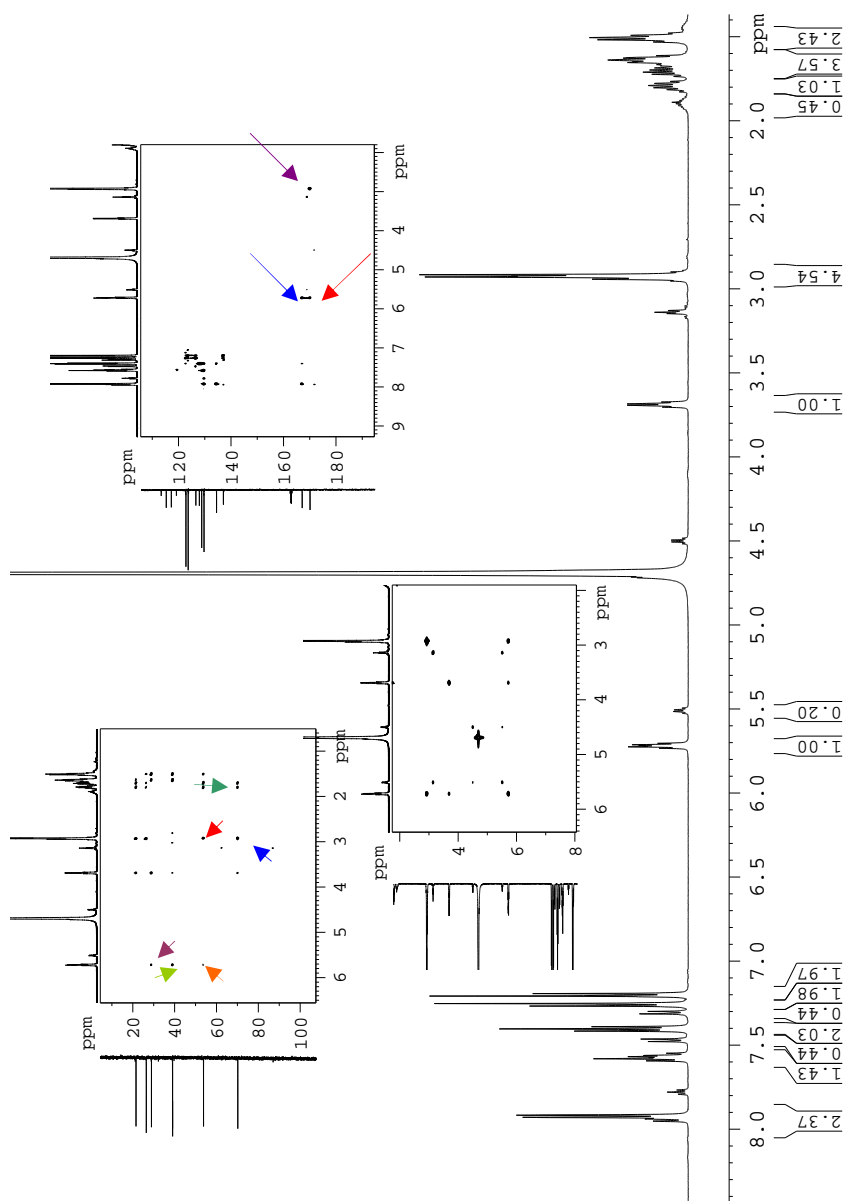
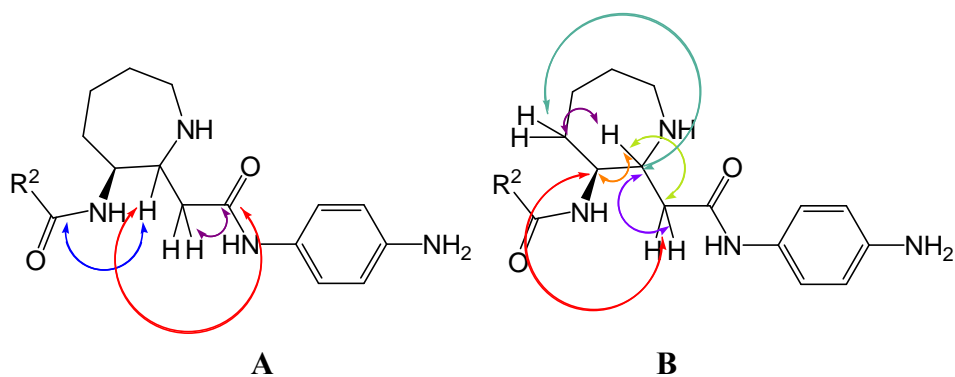
Schemat 3.10: Otrzymywanie α,β -nienasyconych amidów, pochodnych lizyny i argininy. R¹ i R² jak na schemacie 3.4, do ostatniego etapu, w którym usuwa się reszty Cbz. Warunki i reagenty: a) **33**, DBU, LiCl, CH₃CN_{bezwodny}, t. pok.; b/c) 10% anizol w TFA / 10% tioanizol w TFA, t. pok.

Otrzymane pochodne nienasycone **27a**, **27d**, **27f** i **37a** cechuje słaba rozpuszczalność w większości popularnych rozpuszczalników. Dlatego oczyszczano je metodą HPLC po usunięciu z ich grup aminowych reszt ochronnych Cbz. Odblokowanie tych związków z zastosowaniem układu 10% anizol/TFA (pochodne lizynowe) lub 10% tioanizol/TFA (pochodne argininowe) przebiegało z umiarkowanymi wydajnościami.

Jednym z powodów niskiej wydajności otrzymywania docelowych α,β -nienasyconych amidów jest potwierdzona eksperymentalnie wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja tych związków po odblokowaniu ich terminalnych grup aminowych. W wyniku addycji o przebiegu zaproponowanym na schemacie 3.11 docelowy związek **27f** uległ całkowitej przemianie w produkt **39**, którego strukturę potwierdzono jednoznacznie metodami spektroskopowymi (rysunek 3.8).

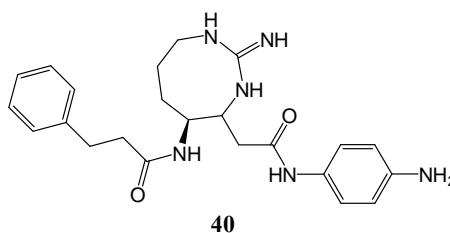


Schemat 3.11: Proponowany mechanizm cyklizacji α,β -nienasyconych amidów, na przykładzie pochodnych N_α -acylowanej lizyny, w warunkach odblokowania (10% anizol w TFA / 10% tioanizol w TFA, t. pok.).



Rysunek 3.8: Struktura pochodnej **39** oraz zestaw widm potwierdzający budowę tego związku: ^1H NMR, COSY, HMBC. Na widmach HMBC strzałkami wskazano sygnały korelacyjne odpowiadające sprzężeniom Cn-Hn+1,...,+3 typu **A** (karbonylowe atomy C z odpowiednimi protonami) i **B** (atomy C 2° i 3° z odpowiednimi protonami), pokazanom za pomocą strzałek o adekwatnych kolorach umiejscowionych przy odpowiednich atomach struktury **39**. Na widmach strzałki dłuższe wskazują sygnały odpowiadające sprzężeniom typu **A**, a krótsze - sygnały pochodzące od sprzężeń typu **B**.

Można założyć, że reakcja addycji grupy guanidynowej łańcucha bocznego reszty P1 pochodnej **38a** do wiązania C=C prowadząca do produktu **40** (rysunek 3.9) przebiega zgodnie z mechanizmem wyjaśniającym powstawanie produktu **39**, który przedstawiono na schemacie 3.11. Należy jednak zaznaczyć, że z mieszaniny reakcyjnej uzyskanej po odblokowaniu związku **37a** izolowano zarówno właściwy produkt **38a**, jak i jego cykliczną pochodną **40**.

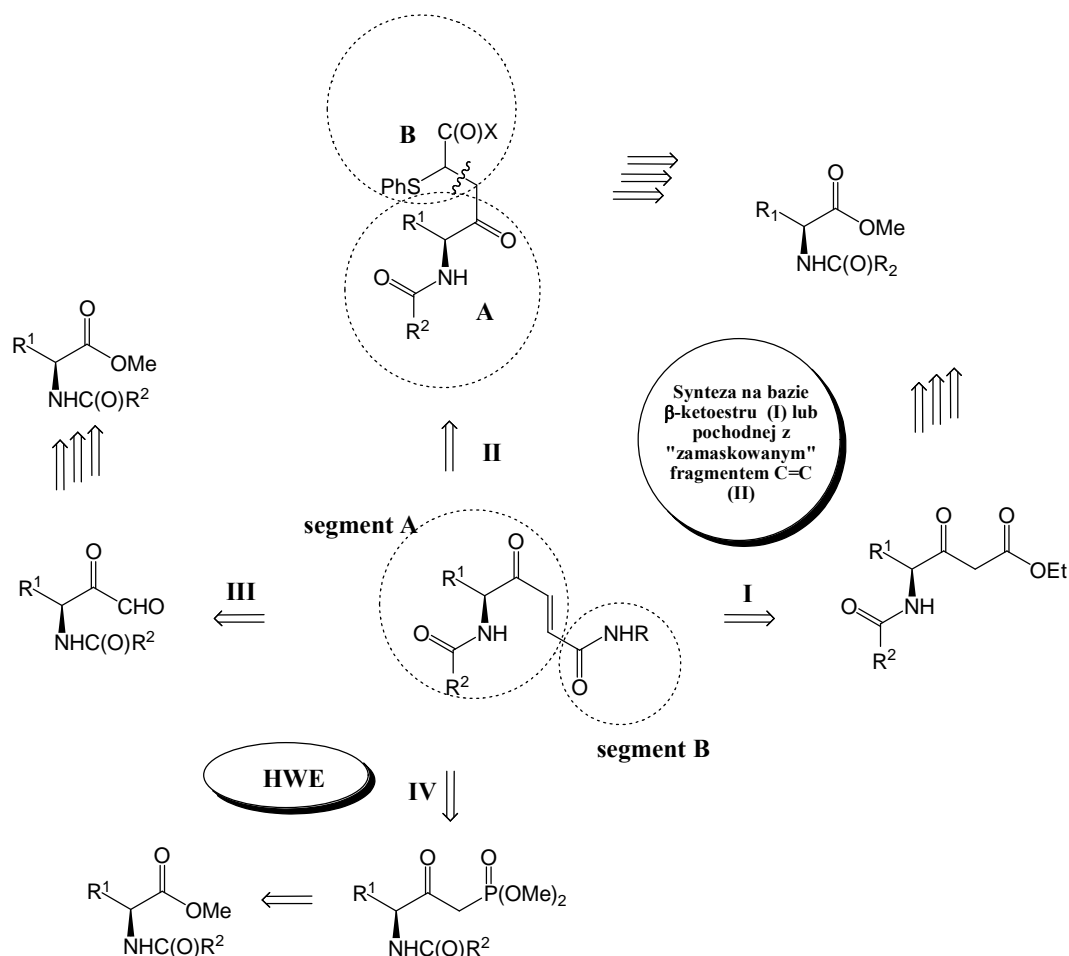


Rysunek 3.9: Struktura produktu wewnątrzcząsteczkowej addycji grupy guanidynowej łańcucha bocznego pochodnej **38a** do wiązania C=C

3.3.3 Synteza pochodnych γ -okso- α,β -nienasyconych

3.3.3.1 Planowanie syntezy

W literaturze dotyczącej syntezy funkcjonalizowanych olefin można znaleźć wiele przykładów otrzymywania pochodnych zawierających w strukturze fragment $-C(O)-C=C-C(O)-NHR$. Jednakże, jak się okazało, odnalezione rozwiązania nie dawały się łatwo zaadaptować w przypadku zaprojektowanych inhibitorów gingipain. Świadczy o tym liczba i rodzaj zaproponowanych, przeprowadzonych i podsumowanych na schemacie 3.12 prób ich syntezy.



Schemat 3.12: Retrosynteza γ -okso- α,β -nienasyconych amidów, pochodnych lizyny i argininy. Zachowano takie same oznaczenia R^n odpowiednich fragmentów, jak w przypadku pochodnych α,β -nienasyconych (schemat 3.4). X = Et, HNC₆H₄NHCbz; Cyfry rzymskie odpowiadają zaplanowanym, kilkusetapowym ścieżkom syntezy (opis w tekście).

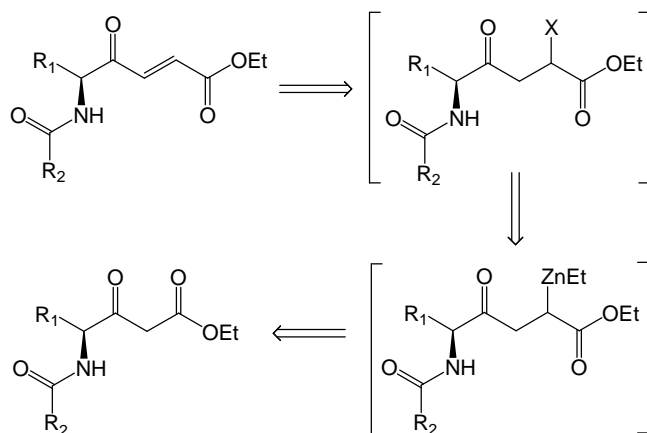
Analiza retrosyntetyczna zaprojektowanych struktur wskazywała na możliwość kilku racjonalnych rozłączeń w docelowych cząsteczkach. Większość z nich sugerowała zastosowanie klasycznej reakcji HWE (ścieżka IV, schemat 3.12) lub jej odmiany z użyciem fosfonoamidu w miejsce fosfonoestru (ścieżka III). Alternatywą było otrzymanie pochodnej, w której wiązanie C=C jest „zamaskowane” resztą tiofenu (ścieżka II). Kolejna możliwość opierała się na odpowiednich przekształceniach prekursora β -ketoestrowego (ścieżka I).

3.3.3.1.1 Ścieżka I

Wybór ścieżki I był uzasadniony z dwóch powodów: braku konieczności izolowania produktów pośrednich i dostępności substratu - β -ketoestru. Zgodnie z danymi literaturowymi, substrat względnie prosto uzyskuje się z odpowiedniego kwasu przekształcanego najpierw w chlorek kwasowy lub mieszany bezwodnik, który w reakcji z wybranym nukleofilem (anion generowany z soli monoestru kwasu malonowego lub anion enolanowy otrzymywany w reakcji bezwodnego octanu etylu z LDA) daje pożądanego ketoester.²²⁹

Alternatywną metodę syntezy β -ketoestru zaproponowali T. Misaki i współpracownicy. Wykorzystuje ona reakcję nazwaną Ti-krzyżową kondensacją Claisen'a, w której następuje krzyżowa kondensacja chlorku kwasowego z estrem w obecności kompleksu aminy trzeciorzędowej i chlorku tytanu.²³⁰ Autorzy metody opracowali proces z dodatkowym katalizatorem – metyloimidazolem, który tworzy z używanym chlorkiem kwasowym aktywny acyloamoniowy produkt przejściowy o charakterze elektrofilowym. Osiągane przez nich wyniki dla różnych estrów i chlorków kwasowych wskazywały na ukierunkowany przebieg reakcji prowadzący do produktów kondensacji krzyżowej a nie prostej kondensacji dwóch cząsteczek estru z dobrą i bardzo dobrą wydajnością.

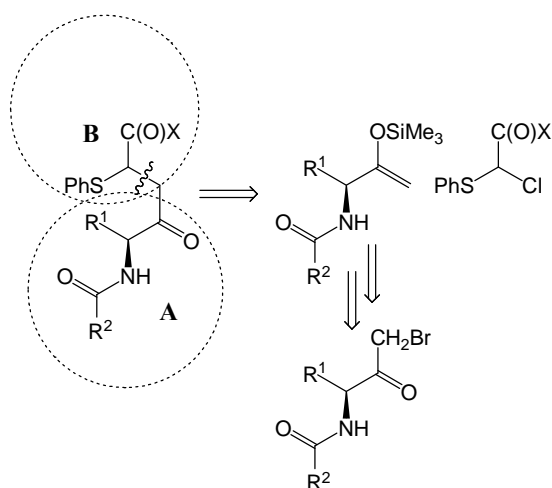
β -Ketoester poddaje się przekształceniu, w którym łańcuch ugrupowania β -ketoestrowego ulega wydłużeniu o fragment CH_2 .²³¹ Tworzący się produkt przejściowy w reakcji z jodem daje pochodną, którą poddaje się reakcji eliminacji w warunkach zasadowych. Eliminacja halogenu prowadzi do docelowego układu γ -okso- α,β -nienasyconego (schemat 3.13). Otrzymany tym sposobem nienasycony ester poddaje się hydrolizie i sprzęga z aminowym prekursorem reszty P1'.



Schemat 3.13: Retrosynteza γ -okso- α,β -nienasyconego estru. Pokazano szczegółowo retrosyntezę według ścieżki I.

3.3.3.1.2 Ścieżka II

Ścieżka II opiera się na odmiennej strategii, którą opracowano chcąc ominąć etap hydrolizy nienasyconego estru koniecznej dla wprowadzenia do struktury inhibitora reszty P1'. Jednym z możliwych rozwiązań jest protekcja wiązania C=C resztą tiofenolu i hydroliza grupy estrowej analogu nasyconego. Rozważano dwa warianty takiego podejścia. Po pierwsze, planowano otrzymanie pochodnej nienasyconej, którą poddawano by reakcji z tiofenolem. Ten wariant wydłuża jednak ścieżkę syntezy, ponieważ modyfikacja cząsteczki mająca chronić wiązanie C=C następuje za kluczowym przejściem prowadzącym do układu nienasyconego. Dlatego wybrano wariant drugi zilustrowany na schemacie 3.14.



Schemat 3.14: Schemat retrosyntezy pochodnej z „zamaskowanym” wiązaniem C=C (ścieżka II).

Drugie podejście pozwalało na wykorzystanie przejść syntetycznych opracowanych podczas otrzymywania halometyloketonów. W tym przypadku odpowiedni bromometyloketon przekształca się najpierw w metyloketon,²⁵⁶ ten z kolei w enolowy eter silylowy,²³²⁻²³⁴ który w reakcji z otrzymywanym w odrębnej syntezie²⁵⁵ prekursorem segmentu B daje docelową pochodną estrową z chronionym wiązaniem C=C.²³⁵ Hydroliza analogu zabezpieczonego resztą tiofenolu poprzedza sprzężenie z prekursorem reszty P1'. Ostatnim etapem ścieżki II jest eliminacja tiofenolu.

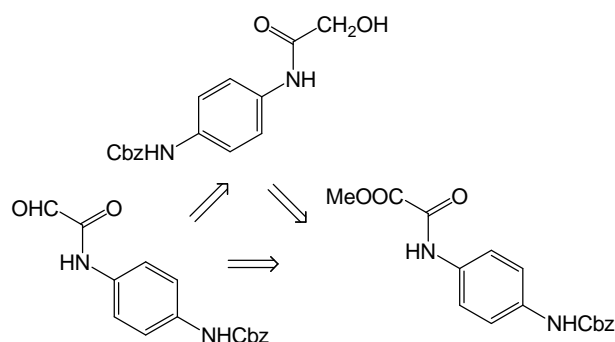
3.3.3.1.3 Ścieżka III i IV

Jednym z problemów syntetycznych, który należało rozwiązać opierając strategię syntezy γ -okso- α,β -nienasyconych amidów na reakcji HWE było przygotowanie odpowiedniego reagenta elektrofilowego zawierającego ugrupowanie oksoaldehadowe. Na schemacie 3.12 pokazano dwa alternatywne podejścia: prekursor segmentu A albo w funkcji reagenta nukleofilowego (ketofosfonian, ścieżka IV) lub w roli elektrofila (oksoaldehyd, ścieżka III). W zależności od wybranej ścieżki stosuje się dwie opcjonalne postaci prekursora segmentu B: fosonoamid lub oksoaldehyd.

Pierwsze z rozwiązań zastosowanych do otrzymania segmentu A bazowało na odpowiedniej pochodnej estrowej zawierającej w strukturze reszty P1 i P2 wyselekcjonowane i zoptymalizowane w toku badań wstępnych przeprowadzonych dla inhibitorów z ugrupowaniem chlorometyloketonowym. Estrowy prekursor przekształca się w oksoaldehyd w kilkietapowej syntezie (ścieżka III, schemat 3.12), w której kluczowym etapem jest reakcja pochodnej diazometinowej z dimetylodioksiranem (DMDO) prowadząca do ketoaldehydu.^{236,237} Wówczas docelową cząsteczkę uzyskuje się w reakcji otrzymanego elektrofila z karboanionem generowanym z fosonoamidowego prekursora segmentu B. W tym przypadku, prekursorem segmentu B jest pochodna **33** stosowana przy syntezie α,β -nienasyconych amidów.

Alternatywnie, segment A można otrzymać według ścieżki IV. Wyjściowy ester przekształca się w β -ketofosfonian,²³⁸ który, po potraktowaniu zasadą, jako karboanion reaguje z odpowiednim oksoaldehydem. Planując ten eksperyment brano pod uwagę dwa warianty otrzymywania segmentu B. W pierwszym, nukleofilem reagującym z karboanionem był handlowy glioksalan etylu. Takie rozwiązanie prowadzi do γ -okso- α,β -nienasyconego estru, który trzeba następnie zhydrolizować, a otrzymany nienasycony kwas sprzężać z aminowym prekursorem reszty P1'. W drugim przypadku

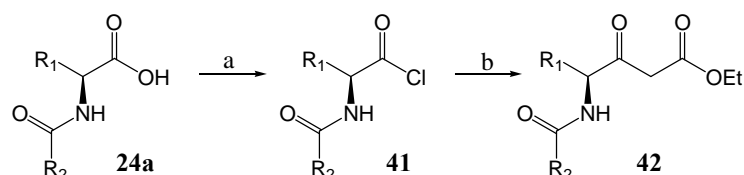
trzeba przygotować oksoldehyd wychodząc z pochodnej estrowej, w której strukturę wbudowano resztę P1' (schemat 3.15).



Schemat 3.15: Szczegóły retrosyntezy prekursora segmentu B wg ścieżki IV.

3.3.3.2 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych estrów z β -ketoestrów (ścieżka I)

Przy wyborze tej ścieżki zasugerowano się pracą, której autorzy zaproponowali wygodny sposób wydłużania łańcucha w ugrupowaniu β -ketoestrowym w reakcji z Et_2Zn w obecności jodku metylenu.²³¹ Uzyskiwany w efekcie produkt pośredni traktuje się jodem, który następnie eliminuje się z utworzonej cząsteczki przy pomocy DBU otrzymując pożądany γ -okso- α,β -nienasycony ester.



Schemat 3.16: Synteza β -ketoestru, prekursora pochodnej γ -okso- α,β -nienasyconej zgodnie ze ścieżką I.

Przeprowadzono dwie próby otrzymywania β -ketoestru. W obu substratem był ester **18a**, który hydrolizowano do kwasu **24a**, a następnie przekształcano w chlorek kwasowy **41** metodą z chlorkiem tionylu.* W pierwszej z prób otrzymanym chlorkiem traktowano karboanion generowany z octanu etylu przy pomocy LDA. Zakończyła się ona niepowodzeniem. Negatywny wynik był prawdopodobnie rezultatem obecności śladów wody w mieszaninie reakcyjnej (duża wilgotność powietrza i mała skala). Problem obecności śladów wody w środowisku reakcji starano się rozwiązać generując

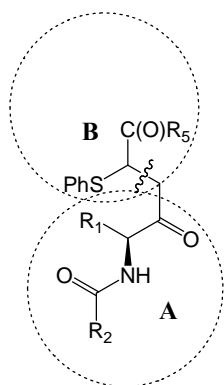
* cytowanie 224

najbardziej narażone na ich obecność reagenty, to znaczy LDA i karboanion octanowy w dużym nadmiarze w znanej objętości mieszaniny reakcyjnej. Przygotowany w oddzielnym procesie chlorek kwasowy wprowadzano do wyznaczonej objętości mieszaniny zawierającej reagent nukleofilowy. Niestety, także i w tym wypadku nie osiągnięto zamierzonego celu.

W drugim podejściu zaadaptowano reakcję Ti-krzyżowej kondensacji chlorku kwasowego i estru. Przeprowadzono ją dla chlorku **41**. Oceniając techniką TLC wynik reakcji stwierdzono powstawanie bardzo wielu produktów, z przewagą związków bardzo polarnych, co nasuwa podejrzenie, że kwaśne warunki reakcji są zbyt drastyczne dla zastosowanej grupy ochronnej Cbz i jej przebieg jest zupełnie inny od zakładanego.

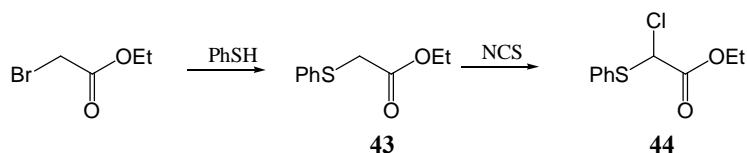
3.3.3.3 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych estrów z bromometyloketonów (ścieżka II)

Tytułowe γ -okso- α,β -nienasycone estry otrzymuje się przez eliminację reszty tiofenolu z pochodnej pokazanej na rysunku 3.10, uzyskiwanej z bromometyloketonu. Synteza wyjściowych bromometyloketonów do etapu diazometyloketonu przebiega analogicznie, jak w przypadku chlorometyloketonów. Diazometyloketon przekształca się w pochodną bromometylową (prekursor segmentu A) w reakcji z HBr w wodzie.



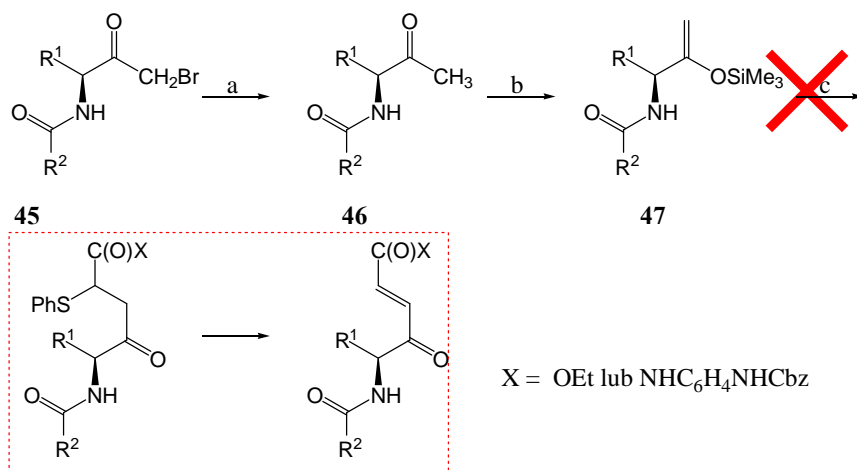
Rysunek 3.10: Struktura analogu γ -okso- α,β -nienasyconego estru, w którym wiązanie C=C jest chronione resztą tiofenolu.

Przebiegająca ilościowo reakcja tiofenolu z bromooctanem etylu dostarcza produktu **43**, którego rodnikowe chlorowanie przy pomocy NCS prowadzi do prekursora fragmentu **B** - 2-chloro-2-(fenyltio)octanu etylu **44**, który oczyszcza się chromatograficznie (schemat 3.17).



Schemat 3.17: Synteza prekursora segmentu **B** analogu γ -okso- α,β -nienasyconego estru pokazanego na rysunku 3.10.

Prekursor segmentu **A** uzyskuje się z bromometyloketonu **45** redukując go najpierw cynkiem w kwasie octowym do metyloketonu **46** i przekształcając go następnie w silylowy eter enolowy **47** poprzez potraktowanie LiHMDS i chlorkiem trimetylosilylowym w obecności trietyloaminy. Proponowana przez autorów pracy,²⁵³ z której zaczerpnięto procedurę syntezy, przeróbka mieszaniny z użyciem wodnego buforu fosforanowego prowadziła do hydrolizy produktu. Być może zastosowanie jako grupy ochronnej bardziej rozbudowanej reszty trójalkylsilylowej pozwoliłoby na zachowanie w jakiejś części enolowej postaci metyloketonu, nawet w obecności wody. Nie można mieć jednak pewności, że substratu byłoby wystarczająco dużo dla przeprowadzenia kolejnego etapu, w którym nieoczyszczony silylowy eter enolowy **47** reaguje z pochodną **44** w warunkach bezwodnych w obecności ZnBr_2 (schemat 3.18).



Schemat 3.18: Próba otrzymania tiofenolowego prekursora γ -okso- α,β -nienasyconego estru z metyloketonu – schemat syntezy. W czerwonej ramce pokazano produkty, których nie udało się otrzymać zgodnie z tą ścieżką. Warunki i reagenty: a) Zn w CH_3COOH , t. pok.; b) LiHMDS, TMSCl, Et_3N , $\text{THF}_{\text{bezwodny}}$, $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.3.4 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych estrów (amidów) w oparciu o reakcję HWE

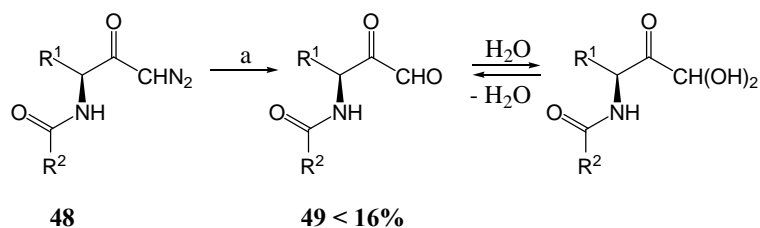
3.3.3.4.1 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconych amidów w reakcji HWE z użyciem modyfikowanego reagenta fosforowego (ścieżka III)

Powodzenie koncepcji użycia amidofosfonianu **33** jako substratu reakcji HWE w przypadku pochodnych **27a**, **27d**, **27f** oraz **37a** skłaniało do opracowania analogicznego rozwiązania dla γ -okso- α,β -nienasyconych amidów. Problemem pozostawało otrzymanie odpowiedniego gliksalu poprzez transformację C-końca substratu.

W pracy Walker'a i współpracowników²³⁶ przedstawiono wygodną metodę przekształcenia diazometyloketonów w oksoaldehydy przy pomocy dimetylodioksyranu (DMDO). Ponieważ syntezę diazometyloketonów **3** i **4** (schemat 3.1) z dobrą wydajnością opanowano przy okazji syntezy chlorometyloketonów, uzasadnione było podjęcie prób przeprowadzenia ich *N*-acylowanych analogów w odpowiednie gliksale, jako potencjalne reagenty HWE. Analogi diazometyloketonowe są produktami przekształcenia odpowiednich *N*-acylowanych kwasów, które otrzymywano poprzez zasadową hydrolizę odpowiedniej pochodnej estrowej. Przekształcenie jest realizowane tak jak w przypadku pochodnych **3** i **4**.

DMDO generowano z oksonu w roztworze acetonowym.²³⁹ Miano roztworu określano w przybliżeniu na podstawie widma protonowego jądrowego rezonansu magnetycznego mieszaniny po reakcji wziętego z nadmiarem tioanizolu z otrzymanym roztworem DMDO.²⁴⁰ Przebieg reakcji (schemat 3.19) otrzymywania pochodnej **49** kontrolowano metodą chromatografii cienkowarstwowej. Ze względu na obecność śladów wody w roztworze DMDO, który zgodnie z zaleceniem autorów procedury suszy się bezwodnym siarczanem sodu, głównym produktem reakcji (wg autorów)²³⁶ jest wodzian pozostający w równowadze z oksoaldehydem. W przypadku pochodnej **49**, na podstawie widma surowego produktu stwierdzono bardzo mały udział aldehydu. Próby suszenia produktu przez destylację azeotropową z bezwodnymi rozpuszczalnikami i mieszanie z sitami molekularnymi nie przynosi żadnej zmiany na widmie protonowym. Wyklucza to raczej obecność preparatywnych ilości oczekiwanego wodzianu. Założono, że reakcja dla tej pochodnej przebiega z bardzo niską, rzędu kilku do kilkunastu procent, wydajnością. W tej sytuacji niemożliwe jest wykorzystanie metody olefinacji opartej na reakcji HWE, którą zastosowano

z powodzeniem dla pochodnych **27a**, **27d**, **27f** oraz **37a**. Bowiem procedura z użyciem amidofosfonianu **33** nawet w przypadku mieszanin zawierających powyżej 50% drugiego reagenta HWE (aldehydu) dawała raczej umiarkowane rezultaty.

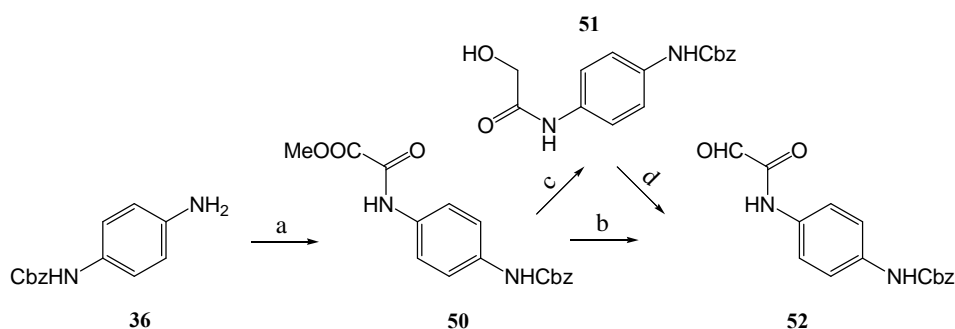


Schemat 3.19: Reakcja otrzymywania oksoaldehydu z diazometyloketonu przy użyciu roztworu DMDO. Warunki i reagenty: a) aq NaHCO₃, aceton; okson, sita molekularne.

3.3.3.4.2 Synteza γ -okso- α,β -nienasyconych estrów (amidów) z β -ketofosfonianów – pochodnych *N*-acylowanych estrów lizyny i argininy (ścieżka IV)

Pozytywny rezultat w syntezie γ -okso- α,β -nienasyconych estrów w oparciu o reakcję HWE uzyskano dopiero po serii eksperymentów, w których jako prekursora karboanionu używano β -ketofosfonianu.

W pierwszym podejściu substraty do reakcji, tj. β -keofosfonian i oksoaldehyd przygotowywano w niezależnych eksperymentach (schematy 3.20 i 3.21). Amid **52** próbowano otrzymać z amidoestru **50**, który był produktem sprzęgania aminy **36** i 2-chloro-2-oksooctanu metylu.

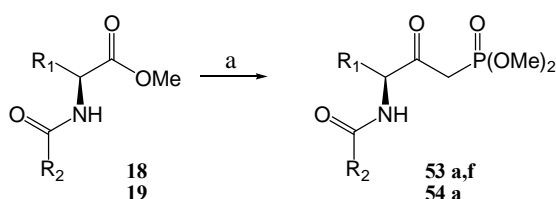


Schemat 3.20: Przygotowanie oksoaldehydowego prekursora segmentu **B** zawierającego w strukturze resztę P1'. Warunki i reagenty: a) MeOC(O)C(O)Cl, Et₃N, 0 °C, THF_{bezwodny}; b) DIBAL-H; c) NaBH₄, LiCl; d) (COCl)₂, DMSO, Et₃N, bezwodny CH₂Cl₂, -60 °C.

Pochodną **50** zredukowano do alkoholu **51** przy pomocy NaBH₄/LiCl. Utlenianie alkoholu do aldehydu w reakcji Swerna nie powiodło się. Widmo protonowe surowej mieszaniny nie ujawnia obecności oczekiwanego produktu. Pożądanego rezultatu nie osiągnięto również stosując bezpośrednią redukcję amidoestru **50** przy pomocy

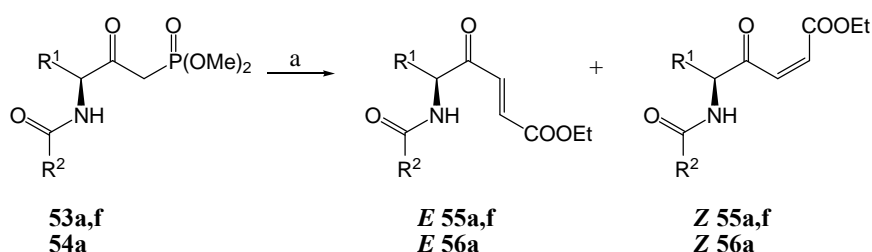
DIBAL-H. W obu przypadkach mieszanina produktów po reakcji była na tyle skomplikowana, że zrezygnowano z jej dokładniejszej analizy.

Przygotowanie drugiego reagenta, β -ketofosfonianu **53a** (schemat 3.21), przebiegało bez komplikacji. Dlatego tą samą metodą otrzymano analogii **53f** oraz **54a**. Związki te otrzymuje się w reakcji odpowiednich *N*-acylowanych estrów z metylofosfonianem dietylu w obecności *n*-butylolitu. Produkty izoluje się z mieszaniny reakcyjnej metodą chromatografii kolumnowej i rekrystalizuje.



Schemat 3.21: Synteza β -ketofosfonianów z *N*-acylowanych estrów lizyny i argininy. Warunki i reagenty: a) $(\text{MeO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_3$, *n*-BuLi, -78°C , THF_{bezwodny}.

Wobec faktu niepowodzenia w syntezie odpowiedniego oksoaldehydu z wbudowanym fragmentem fenylenodiaminy (reszta P1') zdecydowano się użyć handlowego gliksalanu (schemat 3.22).

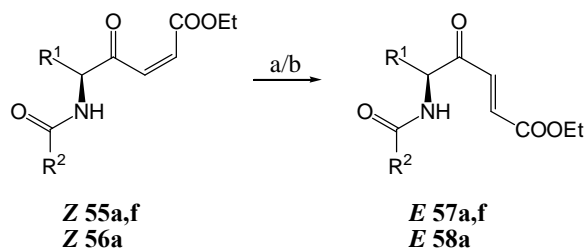


Schemat 3.22: Synteza γ -okso- α,β -nienasyconego estrów, pochodnych *N* _{α} -acylowanych lizyny i argininy z odpowiednich β -ketofosfonianów. Warunki i reagenty: a) $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot \text{C}_{200}$, 50% roztwór w toluenie EtOC(O)CHO, THF, $24-40^\circ\text{C}$, ultradźwięki, 3h.

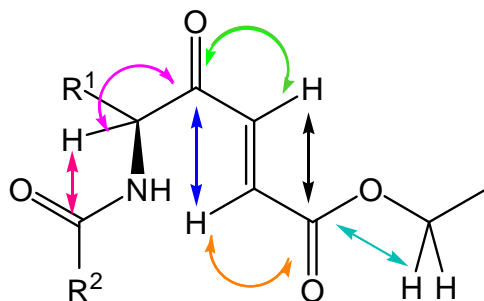
Spośród testowanych zasad stosowanych do generowania karboanionu (*n*-BuLi, DBU, Et_3N , $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) najlepszy okazał się aktywowawny $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Otrzymuje się go z handlowego $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ poprzez wyprażanie. Reakcja z β -ketofosfonianem jest inicjowana ultradźwiękami.^{241,242} Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadza się w minimalnym nadmiarze gliksalan, ogrzewa się ją i kontynuuje sonifikację. Postęp reakcji kontroluje się techniką TLC. Z reguły po 3 godzinach nie obserwuje się dalszej konwersji substratu fosforowego. Mieszaninę po oddzieleniu nierozpuszczalnego osadu przerabia się standardowo, suszy i rozdziela

chromatograficznie. Główną frakcję stanowi właściwy produkt. Drugi z izolowanych produktów to izomer *Z* docelowego związku. Struktury produktów **55a**, **55f** oraz **56a** potwierdzono eksperymentami $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, ^{13}C -NMR, HSQC i HMBC (rysunki 3.11 i 3.12).

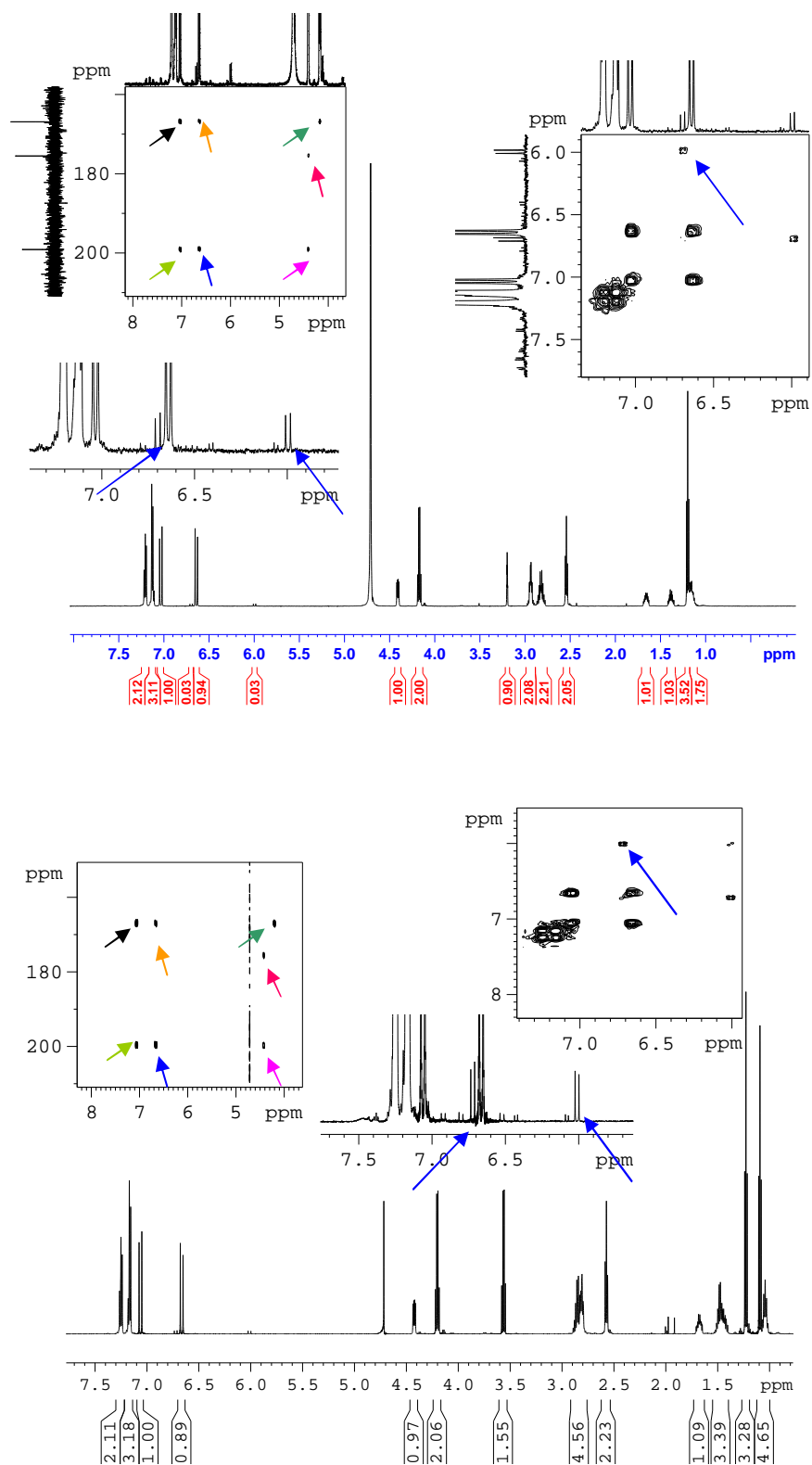
Z obu izomerów *Z* i *E* usunięto w niezależnych eksperymentach reszty ochronne Cbz używając TFA. Stwierdzono, że w warunkach odblokowania następuje izomeryzacja *Z/E* wiązania podwójnego i jedynym produktem izolowanym metodą HPLC jest izomer *E* (schemat 3.23 oraz rysunek 3.11). Prawdopodobnie dochodzi do przyłączenia protonu pochodzącego z TFA do wiązania C=C i osłabienia w tym fragmencie charakteru układu nienasyconego. W efekcie obniżona zostaje energetyczna bariera rotacji, co umożliwia izomeryzację *Z/E* związku. Obecność w środowisku reakcji sprzężonej zasady F_3CCOO^- sprzyja odtwarzaniu wiązania nienasyconego, przy czym powstaje jedynie trwalszy termodynamicznie izomer *E*. W widmie protonowego rezonansu magnetycznego frakcji z HPLC obserwuje się śladowe ilości nieoddzielonego izomeru *Z*, który w zastosowanych warunkach chromatografii osiąga taki sam czas retencji, jak izomer *E*.



Schemat 3.23: Izomeryzacja *Z/E* podczas usuwania grup ochronnych z γ -okso- α,β -nienasyconego estru. Warunki i reagenty: a) TFA, anizol, temperatura pokojowa, 24 godziny (pochodne lizyny); b) TFA, tioanizol, temperatura pokojowa, 48 godzin (pochodne argininy)



Rysunek 3.11: Wzór ogólny pochodnych γ -okso- α,β -nienasyconych. Strzałkami wskazano atomy, dla których jąder atomowych obserwuje się sprzężenie na widmach HMBC (rysunek 3.12). Kolory strzałek na rysunku 3.11 odpowiadają kolorom krótszych strzałek wskazujących sygnały korelacyjne na widmach (rysunek 3.12).



Rysunek 3.12: Widma ^1H NMR, COSY oraz HMBC otrzymanych produktów odblokowania izomerów *Z* pochodnych γ -okso- α,β -nienasyconych **55a** (dół) i **56a** (górze). Pokazano sprzężenie protonów winylowych produktów *E* powstających na skutek izomeryzacji oraz śladowych ilości izomeru *Z* (niebieskie strzałki przy powiększeniu widm ^1H NMR i COSY), a także sprzężenia tych protonów z sąsiadującymi karbonyłowymi atomami węgla (widma HMBC, sygnały korelacyjne wskazano strzałkami, których kolory odpowiadają kolorom z rysunku 3.11).

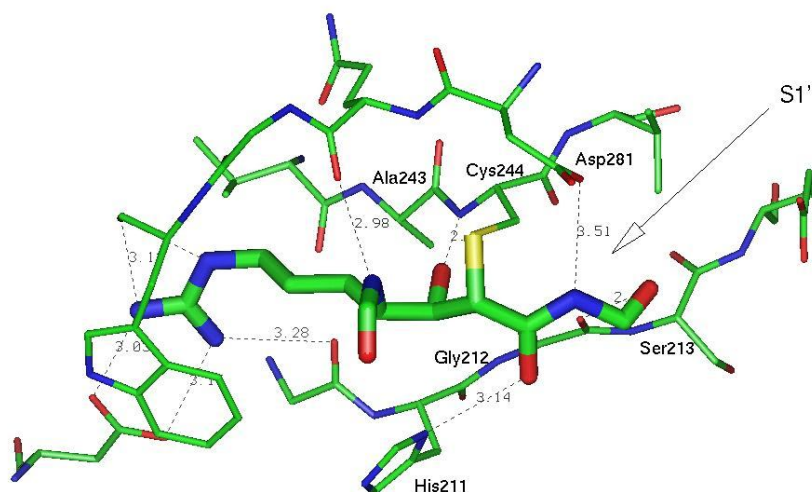
3.3.3.4.3 Otrzymywanie γ -okso- α,β -nienasyconego kwasu z odpowiedniego estru

Podobnie jak w przypadku pochodnych α,β -nienasyconych, γ -okso- α,β -nienasycone estry miały być przekształcone w odpowiednie nienasycone kwasy, które sprzęgano by w oddzielnym etapie z aminowym prekursorem reszty P1', aminą **36**. Pomimo przeprowadzenia szeregu prób odblokowania ugrupowania karboksylowego wzorcowej pochodnej **55a** nie udało się otrzymać oczekiwanego γ -okso- α,β -nienasyconego kwasu. Nieskuteczne okazały się zarówno hydroliza zasadowa (NaOH, KOH, Na₂CO₃, LiOH, woda/alkohol, różne stężenia), która prowadziła do złożonej mieszaniny produktów, substytucja jodkiem sodu w acetonie (w efekcie także skomplikowana mieszanina) oraz próba hydrolizy enzymatycznej lipazami w układzie dwufazowym (brak reakcji). Z tego względu nie zrealizowano kolejnego etapu - otrzymywania γ -okso- α,β -nienasyconego amidu zawierającego resztę P1'.

3.4 Epoksydy

3.4.1 Projektowanie inhibitorów, planowanie syntezy

Jednym z celów opracowania syntezy pochodnych nienasyconych przedstawionych w poprzednich podrozdziałach było uzyskanie prekursorów inhibitorów epoksydowych. Pierścień oksiranowy jest mniej reaktywny w reakcji substytucji nukleofilowej tiolowym atomem siarki w porównaniu do ugrupowania chlorometyloketonowego. Jego obecność w cząsteczce inhibitora gwarantuje zwiększenie selektywności przy zachowaniu aktywności koniecznej do kowalencyjnego związania katalitycznej reszty cysteiny w enzymie. Epoksydowe analogi inhibitorów zawierających resztę kwasu fumarowego lub maleinowego, zgodnie z danymi literaturowymi, są aktywniejsze od swoich nienasyconych prekursorów.



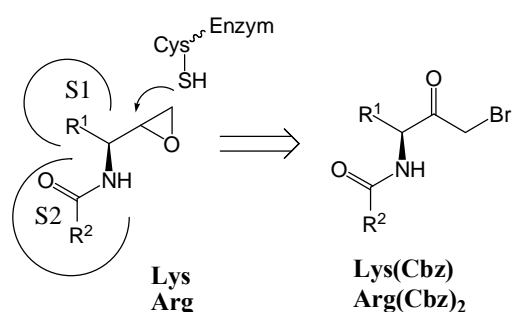
Rysunek 3.13: Sieć oddziaływań tworząca się po nukleofilowym ataku katalitycznej reszty Cys RgpB na pierścień oksiranowy hipotetycznego α -keto- α' -amidoepoksydu, pochodnej argininy. Pokazano m.in. wiązanie wodorowe powstające między atomem azotu His211 oraz atomem tlenu grupy hydroksylowej tworzącej się na skutek otwarcia pierścienia epoksydowego. (S - żółty, O - czerwony, N - niebieski, przerywana szara linia odpowiada wiązaniom wodorowym, a wartość liczbową nad nią odległości wyrażonej w Å).

Wbudowanie do struktury inhibitora pierścienia oksiranowego, fragmentu ketoepoksydowego lub reszty kwasu epoksybursztynowego zwiększa liczbę możliwych oddziaływań liganda z centrum aktywnym gingipainy (rysunek 3.13). Na skutek otwarcia pierścienia oksiranowego w reakcji z resztą Cys244 tworzy się grupa hydroksylowa, która poprzez analogię do karbonylowego atomu tlenu inhibitora D-Phe-

L-Phe-L-ArgCH₂Cl może uczestniczyć w tworzeniu wiązań wodorowych z grupami amidowymi Gly212 i Cys244 RgpB. W przypadku fragmentu α -ketoepoksydowego (schemat 3.25), obok wspomnianych oddziaływań ugrupowania karbonylowego z resztami Gly i Cys, zgodnie z postulowanym mechanizmem otwarcia pierścienia, na atomie położonym w pozycji β w stosunku do C=O powstanie ugrupowanie hydroksylowe. Znajdzie się ono w odległości wystarczającej do utworzenia wiązania wodorowego z atomem azotu His211, który ulega deprotonacji podczas otwarcia oksiranu.

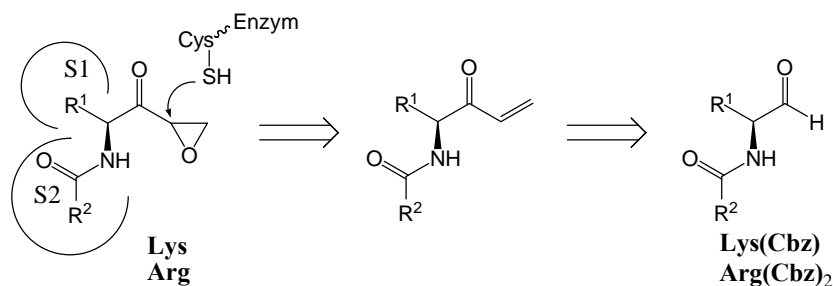
Dodatkowa reszta karbonylowa położona za pierścieniem po stronie karboksylowej inhibitora, jak w przypadku pochodnych zawierających resztę kwasu bursztynowego lub epoksyamidową (schemat 3.26), może oddziaływać z amidowym atomem azotu Gly212. Obecność amidowego atomu azotu w ugrupowaniu znajdującym się za pierścieniem epoksydowym stwarza możliwość tworzenia wiązania wodorowego z Glu214.

Pierwotnie planowano otrzymać cztery typy inhibitorów epoksydowych. Najprostsze N_α -acylowane amino epoksydy otrzymuje się z odpowiednich bromometyloketonów (schemat 3.24).



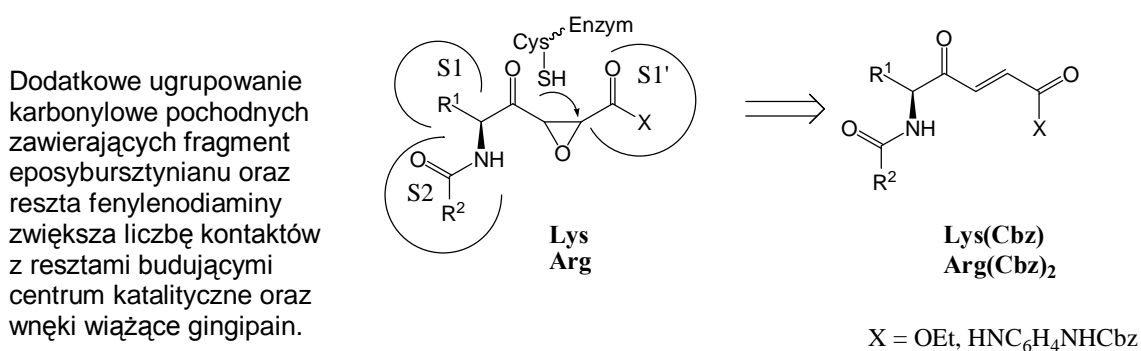
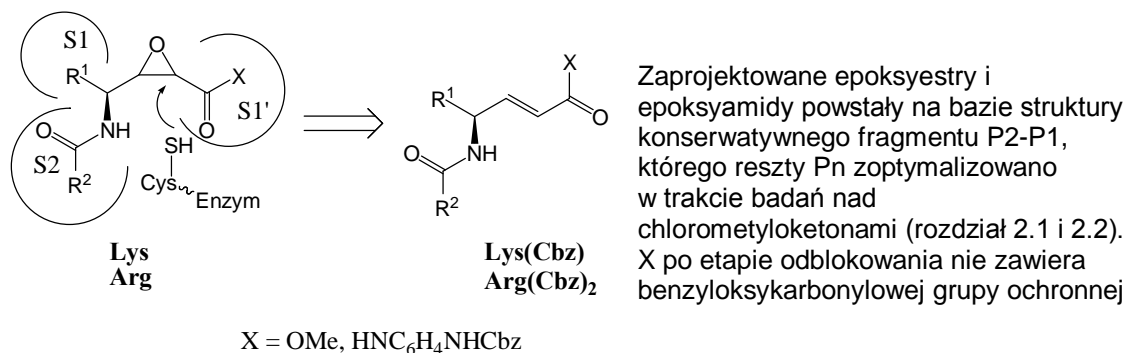
Schemat 3.24: Retrosynteza zaprojektowanych N_α -acylowanych aminoepoksydowych inhibitorów gingipain

Pochodne α -ketoepoksydowe powstają jako produkty utlenienia wiązania C=C odpowiednich 3-hydroksy nienasyconych prekursorów otrzymywanych z N_α -acylowanych aminoaldehydów w reakcji Grignard'a. (schemat 3.25).



Schemat 3.25: Retrosynteza zaprojektowanych α -ketoepoksydowych inhibitorów gingipain

Selektywne utlenienie wiązania C=C w akceptorach Michael'a, których syntezę opisano w rozdziale 3.3, miało prowadzić do dwóch kolejnych typów zaprojektowanych oksiranów (schemat 3.26).

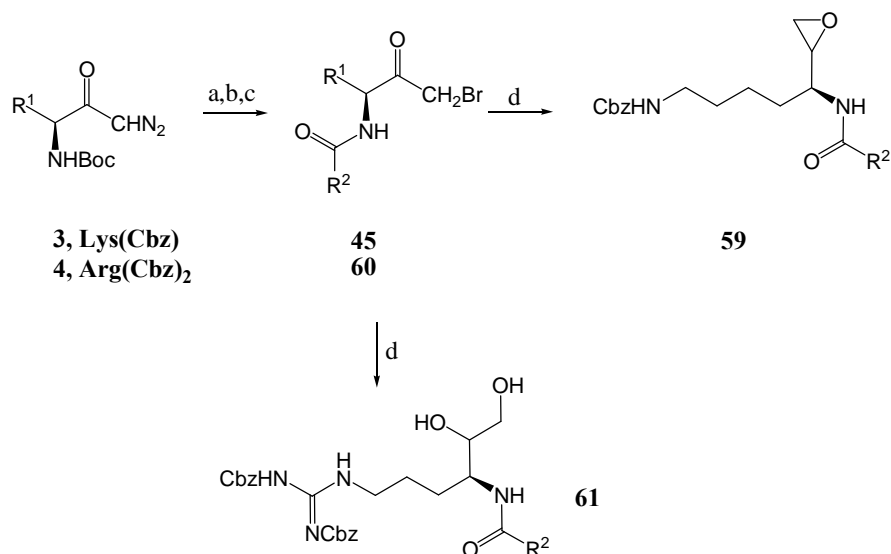


Schemat 3.26: Retrosynteza zaprojektowanych epoksydowych pochodnych α,β -nienasyconych estrów i amidów oraz γ -okso- α,β -nienasyconych estrów i amidów, inhibitorów gingipain typu akceptorów Michael'a

3.4.2 Synteza

N_α -acylowane aminoepoksydy (schemat 3.24) otrzymywano metodą redukcijną z odpowiednich bromometyloketonów^{210,244} z użyciem borowodoru sodu. Bromometyloketony otrzymywano z diazometyloketonów, których syntezę opisano w podrozdziale 3.2.1.

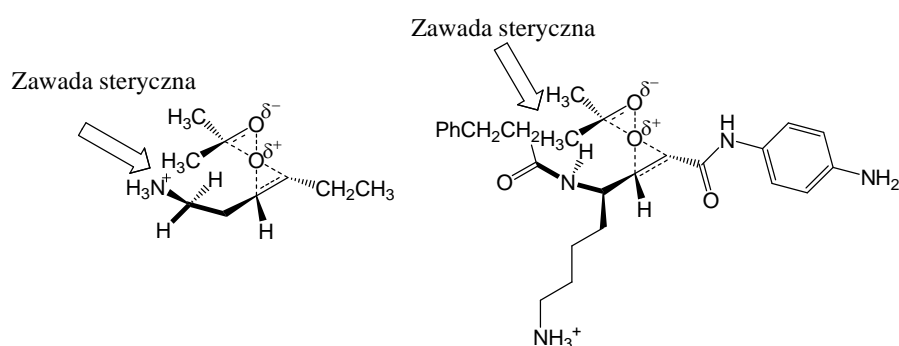
Pochodne diazometinowe (**3**, **4**) traktowano wodnym roztworem HBr i po standardowej przeróbce oczyszczano chromatograficznie, a następnie acylowano odpowiednim reagentem. W przypadku acylowanej pochodnej lizyny **45** produktem reakcji z NaBH₄ był rzeczywiście epoksyd **59**. Natomiast analogiczna pochodna argininowa **60** dała diol **61** (schemat 3.27).



Schemat 3.27: Otrzymywanie α -aminoepoksydów, pochodnych lizyny i arginyiny; Reagenty: a) 40% HBr w H₂O; b) HCl/MeOH; c) R²C(O)Cl lub R²C(O)OC(O)-*i*-Bu, Et₃N; d) NaBH₄

Epoksydację pochodnych α,β -nienasyconych (schemat 3.26) opracowywano na bazie związku **27a**. Ponieważ grupy ϵ -aminowa reszty lizyny i guanidynowa reszta arginyiny w nienasyconych prekursorach epoksydów były chronione resztą benzyloksykarbonylową, którą usuwa się hydrogenolitycznie lub poprzez potraktowanie kwasem, zakładano możliwość otwarcia pierścienia epoksydowego na etapie usuwania grup ochronnych. Dlatego zdecydowano, że epoksydację związków nienasyconych lepiej przeprowadzić po uprzednim usunięciu reszt blokujących. Wybrana metoda otrzymywania odblokowanego związku **27a** prowadzi do jego trifluorooctanowej soli. W pracy Asensio i współpracowników²⁴⁶ podano, że protonowanie grup aminowych kwasami arylosulfonowymi w związkach nienasyconych lub kompleksowanie tych grup z BF₃ jest skuteczną metodą ich protekcji przed utlenieniem w różnych warunkach epoksydacji. Wartości pK_a dla kwasów arylosulfonowych są wyższe niż w przypadku TFA. Z tego względu zastąpienie małej reszty TFA resztą używanego w cytowanej pracy kwasu *p*-chlorofenylosulfonowego wiązałoby się z koniecznością przeprowadzenia związku **28a** w warunkach zasadowych do postaci wolnej aminy i ponownego zakwaszenia środowiska reakcji tym kwasem. Są to dodatkowe operacje, które ze względu na ograniczoną ilość substratu powodowałyby znaczne straty. Był to jeden z powodów, dla którego zdecydowano się na bezpośrednie utlenienie trójfluorooctanowej soli pochodnej nienasyconej **28a** przy pomocy DMDO w acetonie. Pierwsza z obserwacji dokonanych podczas tej próby to brak reakcji na wiązaniu C=C, nawet przy użyciu 1,5-2,5 ekwiwalentu utleniacza. W przypadku bliskiego sąsiedztwa

wiązania nienasyconego i elektroakceptorowej grupy amoniowej mówi się o jego dezaktywacji na skutek zmniejszenia gęstości elektronowej tego wiązania. Ponieważ przeniesienie atomu tlenu ze spolaryzowanej cząsteczki DMDO do takiego układu jest procesem elektrofilowym, obecność w cząsteczce grupy NH_3^+ w odległości 2-3 wiązań od fragmentu $\text{C}=\text{C}$ nie sprzyja reakcji i znacznie wydłuża jej czas. W przypadku pochodnej **28a** odległość grupy aminowej elastycznego łańcucha bocznego reszty lizyny jest jednak zbyt duża by w postaci soli wywołać wystarczająco silny efekt indukcyjny w wiązaniu $\text{C}=\text{C}$. Bardzo wolny przebieg reakcji w tym regionie ma natomiast inne podstawy strukturalne. Utleniana pochodna **28a** posiada geometrię *E*. Poprzez analogię do prezentowanego na rysunku 3.14 modelu stanu przejściowego^{247,248} w reakcji izomeru *E* pochodnej nienasyconej z DMDO można wnioskować, że fragment *gem*-dimetylowy utleniacza stanowi zawadę steryczną.



Rysunek 3.14: Model stanu przejściowego reakcji utleniania soli alkenyloamoniowej za pomocą DMDO^{247,248} (lewa część rysunku) oraz proponowany model wyjaśniający niską reaktywność otrzymanego α,β -nienasyconego amidu w warunkach utleniania DMDO.

Utrudnia ona jego oddziaływanie z wiązaniem podwójnym na skutek stłoczenia w przestrzeni z objętościowym podstawnikiem atakowanego fragmentu związku **28a**. W efekcie nawet wielogodzinne mieszanie nienasyconego substratu z utleniaczem nie daje oczekiwanego epoksydu. Ta obserwacja jest zgodna z wynikami eksperymentów, w których porównywano przebieg reakcji *E* i *Z*-olefin z DMDO. Stwierdzono, że izomery *E* są w tej przemianie dziesięciokrotnie mniej reaktywne od swoich analogów *Z*.^{247,248}

Dodatkowym problemem jest obecność w cząsteczce **28a** dwóch grup aminowych, które utleniają się znacznie łatwiej od wiązania $\text{C}=\text{C}$. Nie przeprowadzono dodatkowych eksperymentów, które wyjaśniłyby, czy reszta TFA wystarczająco chroni atom azotu N_ϵ reszty lizyny przed utlenieniem. Natomiast, podobnie jak w przypadku

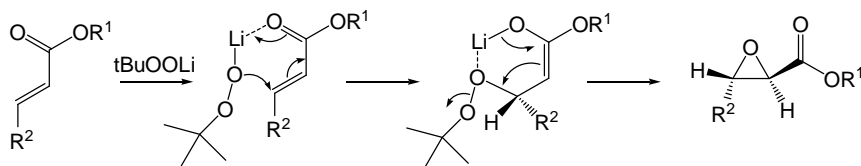
eksperymentów, w których roztworem DMDO traktowano *p*-chlorobenzenosulfoniany alkenyloamoniowe otrzymywane z amin aromatycznych, stwierdzono powstawanie produktów utlenienia aminowego podstawnika pierścienia benzenowego. W widmie protonowego rezonansu magnetycznego poddanej reakcji pochodnej **28a** zaobserwowano przesunięcie sygnałów aromatycznych atomów wodoru fragmentu fenylendiaminowego w kierunku niższych wartości natężenia pola magnetycznego, co sugeruje zmianę w podstawniku pierścienia powodującą zwiększenie jego elektronoakceptorowego charakteru. Ponieważ w widmie ¹H NMR tego związku wciąż były obecne sygnały protonów winylowych: dublet przy 5.93 ppm i dublet dubletów przy 6.69 ppm, ale podobnie jak sygnały od pierścienia aromatycznego: dublet przy 7.78 ppm i dublet przy 8.31 ppm, przesunięte względem odpowiadających im sygnałów z widma substratu, odpowiednio dublet przy 5.85 i dublet dubletów przy 6.60 ppm oraz dublet przy 7.36 ppm i dublet przy 7.59 stwierdzono, że wyizolowany analog jest produktem utlenienia wolnej grupy aminowej reszty P1'. Niezależnie od tego czy reszta TFA spełnia funkcję ochronną grupy aminowej łańcucha bocznego lizyny przed utlenieniem, protonowanie tej grupy ma miejsce, na co wskazuje dobra rozpuszczalność w wodzie otrzymanej pochodnej. Natomiast nie jest to skuteczna metoda zabezpieczenia grupy funkcyjnej amin aromatycznych. Powodem jest prawdopodobnie przesunięcie równowagi sól-wolna amina w kierunku formy zdeprotonowanej, co wynika z niskiej zasadowości tych amin.

Podjęto również próby epoksydacji zablokowanej pochodnej **27a**. Przetestowano trzy metody: utlenianie nadkwasem (kwasem *m*-chloronadbenzoesowym, *m*-CPBA)²⁵⁰, reakcję z DMDO oraz opracowaną przez Meth-Cohn'a i współpracowników metodę²⁵¹ dla alkenów z deficytem elektronowym w układzie C=C.

Podstawowym problemem w przypadku α,β -nienasyconego amidu **27a** była jego niska rozpuszczalność w stosowanych rozpuszczalnikach: chlorku metylenu w reakcji z *m*-CPBA oraz w acetonie w reakcji z DMDO. Prawdopodobnie była to główna przyczyna braku postępu reakcji mimo długiego czasu jej prowadzenia. Biorąc pod uwagę fakt, że niepowodzenie epoksydacji może wynikać z tak podstawowych powodów, trudno ocenić ewentualny wkład diskutowanego wcześniej wpływu geometrii substratu na przebieg utleniania.

Zastanawiająca jest natomiast niska reaktywność *E*-nienasyconej pochodnej **27a** w metodzie Meth-Cohn'a. W tym wypadku czynnikiem utleniającym jest *t*-BuOOH, a reakcję prowadzi się w tetrahydrofuranie, w którym pochodna **27a** rozpuszcza się

względnie dobrze. Również w tych warunkach nie udało się otrzymać analogu epoksydowego, chociaż geometria „E” zgodnie z postulowanym mechanizmem²⁵² tej reakcji powinna sprzyjać tworzeniu oksiranu (schemat 3.28).



Schemat 3.28: Postulowany mechanizm epoksydacji α,β -nienasyconych estrów w metodzie Meth-Cohn'a

Podsumowując tą część badań własnych należy stwierdzić, że wybrane metody otrzymywania epoksyamidowych inhibitorów gingipain z odpowiednich nienasyconych analogów okazały się nieskuteczne. Wybór zastosowanych strategii opierał się na zachęcających wynikach opisanych w materiałach źródłowych, na których podstawie planowano ścieżki syntezy. Chociaż w literaturze można znaleźć szereg alternatywnych metod epoksydacji analogicznych związków, trudno dotrzeć do wiarygodnych metod usuwania reszt ochronnych Cbz, które byłyby zachowawcze dla pierścienia oksiranowego. Był to zasadniczy powód rezygnacji z dalszych prób przekształcania zablokowanych pochodnych nienasyconych w epoksydy. Budząca największe nadzieje metoda polegająca na utlenianiu odpowiednich soli ich odblokowanych analogów również okazała się nieskuteczna.

Trzeba wspomnieć o jeszcze jednym problemie związanym z reaktywnością oksiranów. Pierścień oksiranowy na skutek reakcji z ugrupowaniem aminowym ulega otwarciu. Zaprojektowane pochodne po odblokowaniu zawierają wolne grupy aminowe, a więc możliwe byłoby autokatalityczne otwarcie ich pierścienia epoksydowego, a tym samym dezaktywacja inhibitora. Mimo tego, podjęto wyzwanie ich syntezy podpierając się pozytywnymi wynikami uzyskanymi dla pochodnych chlorometyloketonowych. W ich przypadku istniało podobne ryzyko międzycząsteczkowej lub wewnątrzcząsteczkowej reakcji substytucji nukleofilowej. Mimo to, przechowywane w niskiej temperaturze przez kilka miesięcy pozostawały aktywnymi inhibitorami gingipain.

Wobec trudności napotkanych przy próbie syntezy epoksydowych analogów otrzymanych pochodnych α,β -nienasyconych oraz znanego z literatury faktu niskiej aktywności pochodnych kwasu epoksybursztynowego wobec proteaz klanu CD,²⁴⁹

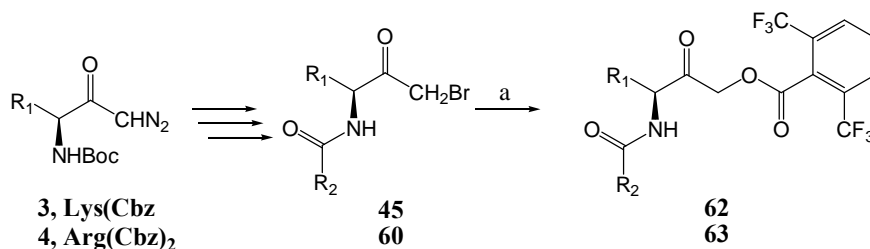
w tym gingipain, zrezygnowano z prób przekształcenia uzyskanych γ -okso- α,β -nienasyconych estrów w odpowiednie oksirany.

3.5 Acyloksymetyloketony

W rozdziale 3.1, w którym w sposób ogólny omówiono projektowanie inhibitorów gingipain, wśród pokazanych ligandów z rozbudowaną resztą na C-końcu znalazły się również acyloksymetyloketony (rysunek 3.1). Pochodne te, jako mniej reaktywne od chlorometyloketonów w reakcji S_N2 , stanowią odrębną grupę inhibitorów o wyższej selektywności względem gingipain. Zaletą tej klasy związków jest ich wysoka skuteczność względem proteaz cysteinowych i brak reaktywności w stosunku do proteaz serynowych.⁸⁷ Wynika to przede wszystkim z wyższej nukleofilowości grupy funkcyjnej katalitycznej reszty cysteiny, dzięki której możliwe jest spowodowanie odejścia słabej grupy odchodzącej, jaką jest reszta kwasu karboksylowego. W klasycznych warunkach reakcji S_N2 nie obserwuje się podstawienia takiej reszty. W przypadku acyloksymetyloketonów zakłada się,⁸⁷ że na skutek ścisłego dopasowania odpowiednio zaprojektowanego liganda do docelowego enzymu zostaje obniżona bariera aktywacji reakcji substytucji. Dzięki temu reakcja, która nie miałaby szans zachodzić w obecności prostych związków chemicznych reagujących jako nukleofile, ale nie wchodzących w dodatkowe interakcje z inhibitorem (substancje znakujące), przebiega na skutek korzystnych oddziaływań z enzymem. Taka charakterystyka acyloksymetyloketonów pozwala zaszeregować je do inhibitorów znakujących na skutek powinowactwa do enzymu. Wyróżniającą cechą tej klasy związków jest możliwość wbudowania do ich struktury reszty odchodzącej, komplementarnej do wnęki (wnęk) wiążącej enzymu, co stwarza możliwość oddziaływań, które ułatwiają alkilowanie katalitycznej reszty cysteiny.

Zaprojektowane acyloksymetyloketony miały być analogami chlorometyloketonów otrzymanych w celu określenia specyficzności wnęk wiążących S2 i S3 RgpB i Kgp. Do syntezy wybrano pochodne, których budowę zaplanowano w oparciu o strukturę najaktywniejszych chlorometyloketonów.

Tytułowe acyloksymetyloketony otrzymuje się z *N*-acylowanych bromometyloketonów w reakcji z odpowiednimi kwasami w obecności KF (schemat 3.29).⁸⁷ Syntezę tych ostatnich opisano w rozdziale 3.4.2.



Schemat 3.29: Synteza *N*-acylowanych acyloksymetyloketonów z odpowiednich bromometyloketonów, pochodnych lizyny (**45**) i arginyiny (**60**). Reagenty: a) kwas 2,6-di-(trifluorometylo)benzoesowy, KF, DMF_{bezwodny}

Tą metodą otrzymano pochodną lizyny (**62**) i arginyiny (**63**). Na etapie usuwania grup ochronnych Cbz z pochodnej argininowej musiały zachodzić liczne reakcje uboczne, co skutkowało powstawaniem wielu produktów trudnych do rozdzielania techniką HPLC. Z powodzeniem uzyskano odblokowaną formę pochodnej lizyny **62**. Porównano aktywność tego inhibitora i jego chlorometyloketonowego analogu: odblokowany związek **62**, $k_{\text{obs}} = 0,0197 \text{ [s}^{-1}\text{]}$; $k_{\text{obs}}/[\text{I}] = 3,46 \times 10^5 \text{ [mol}^{-1}\text{s}^{-1}\text{]}$; **11a**, $k_{\text{obs}} = 0,0431 \text{ [s}^{-1}\text{]}$; $k_{\text{obs}}/[\text{I}] = 4,46 \times 10^6 \text{ [mol}^{-1}\text{s}^{-1}\text{]}$. Zmiana reaktywnego ugrupowania elektrofilowego inhibitora prowadzi do dziesięciokrotnego obniżenia jego aktywności względem Kgp.

4 PODSUMOWANIE

4.1 Streszczenie otrzymanych wyników

4.2 Perspektywy

4.1 Streszczenie otrzymanych wyników

Zaprezentowane w niniejszej dysertacji wyniki uzyskane w toku badań dotyczących otrzymywania inhibitorów gingipain można pogrupować w dwie kategorie. Po pierwsze są to wyniki eksperymentalne bezpośrednio związane z rozwiązywaniem problemów badawczych przedstawionych w rozdziale 2. Druga kategoria obejmuje szereg wniosków o znaczeniu ogólnym opracowanych w oparciu o dane eksperymentalne, przydatnych z punktu widzenia kontynuacji prezentowanej tematyki.

Do pierwszej grupy osiągnięć można włączyć opracowanie syntezy i warunków oczyszczania dipeptydowych i tripetydowych halometyloketonów zawierających reszty nieaminokwasowe. W efekcie otrzymano serię chlorometyloketonów, które okazały się skutecznymi inhibitorami RgpB oraz Kgp. Pozwoliło to na udoskonalenie opracowanego przez Dr Jolantę Grembecką wstępnego modelu struktury Kgp, w szczególności wnęk wiążących Sn enzymu, co można uznać za osiągnięcie ważne dla kontynuacji badań nad inhibitorami gingipain.

Otrzymane chlorometyloketony posłużyły jako narzędzia do optymalizacji reszt wiązanych we wnękach Sn gingipain. Przy ich pomocy ustalono preferencje substratowe kieszeni S2 enzymu. Stwierdzono także, iż nie ma konieczności rozbudowywania inhibitorów o kolejne reszty Pn, gdyż powinowactwo ligandów do badanych enzymów zależy przede wszystkim od budowy fragmentu P2-P1. Zdobyte informacje wykorzystano projektując syntezę inhibitorów o potencjalnie wyższej selektywności.

W pierwszej grupie osiągnięć można umieścić również opracowanie wygodnej metody syntezy α,β -nienasyconych amidów z użyciem modyfikowanego odczynnika HWE. W oparciu o tą metodę otrzymano serię pochodnych typu akceptorów Michaela.

W tej samej grupie rezultatów powinny znaleźć się wyniki szeregu przeprowadzonych prób syntezy γ -okso- α,β -nienasyconych estrów (amidów), pochodnych lizyny i argininy. Choć w większej części nie dostarczyły one pożądanych cząsteczek, jednakże pozwoliły w szerszym kontekście spojrzeć na zastosowane do ich syntezy propozycje rozwiązań zaczerpnięte z literatury i do niektórych odnieść się krytycznie, a w przypadku innych, zwrócić uwagę na możliwe ograniczenia ich stosowalności. Pomimo napotkanych trudności, w efekcie tych prób zsyntezowano inhibitory zawierające w strukturze reszty kwasu fumarowego i maleinowego.

Skutecznie rozwiązano także problem odblokowania i wyizolowania otrzymanych pochodnych nienasyconych. Badania nad ich aktywnością względem gingipain są obecnie prowadzone w Zakładzie Inżynierii Białka w ramach współpracy z Uniwersytetem Wrocławskim. W trakcie realizacji tej części badań zaobserwowano ciekawy efekt izomeryzacji *Z/E* otrzymanych γ -okso- α,β -nienasyconych estrów pod wpływem używanego do ich odblokowania TFA. Zasugerowany mechanizm tej przemiany jest obecnie weryfikowany metodami obliczeniowymi przez mgr Michała Jewgińskiego i będzie dyskutowany w innym opracowaniu po uzyskaniu niezbędnych wyników.

Warto wspomnieć jeszcze o wynikach związanych z epoksydacją wybranych pochodnych nienasyconych. W przypadku otrzymanych nienasyconych prekursorów oksiranów nie potwierdzono skuteczności proponowanej w literaturze metody protekcji grup aminowych przed utlenieniem w zastosowanych warunkach epoksydacji poprzez ich kompleksowanie z $\text{Et}_2\text{O}\times\text{BF}_3$ lub protonowanie kwasem organicznym.

Szczegółowa dyskusja problemów, które pojawiły się w czasie wykonywania zaprojektowanych eksperymentów i w sposób obiektywny uniemożliwiły pomyślnie zrealizowanie wszystkich założeń była przedstawiana systematycznie podczas omawiania poszczególnych etapów przeprowadzonych badań we wcześniejszych rozdziałach niniejszej dysertacji. W większości przypadków trudności dotyczyły dobrze znanego w syntezie organicznej problemu opracowania ścieżek otrzymywania pochodnych zawierających w strukturze różne reaktywne grupy funkcyjne. Wymagają one bardzo rzetelnego doboru metod, które pozwalają na selektywne ich przekształcanie. Wybrane strategie syntezy zawiodły w kilku punktach, co było efektem np. wyjątkowej labilności zastosowanej reszty ochronnej Cbz w warunkach, dla których jest ona standardowo stosowana lub zaskakująco niskiej wydajności niektórych kluczowych etapów syntezy, w których opierano się na znanych z literatury przykładach otrzymywania określonego fragmentu struktury (np. pochodne aldehydowe, czy oksoaldehydy). Obserwacje te, omówione we wcześniejszych rozdziałach, chociaż dotyczą wyników negatywnych, mogą okazać się praktyczną wskazówką dla wykonawców innych projektów, w których pojawiają się podobne cząsteczki i analogiczne przejścia syntetyczne.

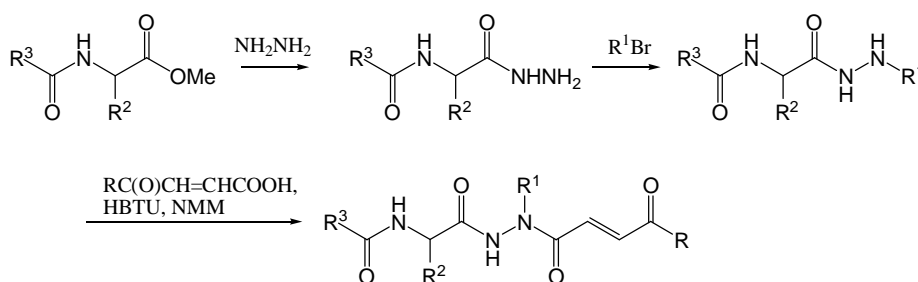
4.2 Perspektywy

Wyniki przedstawione w niniejszej dysertacji mogą stanowić punkt wyjścia dla dalszych prac nad inhibitorami gingipain. Otrzymane związki stanowią narzędzia, które można wykorzystać do zdobycia nowych informacji o centrum aktywnym gingipainy K, niezbędnych do przygotowania skuteczniejszych i mniej złożonych w syntezie inaktywatorów tego enzymu.

W najbliższej perspektywie należałoby rozszerzyć badania nad wpływem obecności dodatkowych reszt Pn' w cząsteczkach inhibitorów gingipain na ich skuteczność i selektywność.

Otwarta pozostaje kwestia włączenia fragmentu fenylenodiaminy, wyselekcjonowanego jako obiecujący podstawnik P1' spośród fragmentów wygenerowanych metodami modelowania molekularnego, do struktury otrzymanych γ -okso- α,β -nienasyconych estrów.

Ciekawym pomysłem wydaje się uproszczenie syntezy pochodnych α,β -nienasyconych rozszerzające możliwości różnicowania podstawników Pn'. Jednym z nasuwających się rozwiązań znanych z literatury jest zamiana aminokwasowej reszty P1 inhibitorów na analog, w którym atom węgla C α został zastąpiony atomem azotu. Stosowana w tym przypadku procedura syntetyczna została przedstawiona na schemacie poniżej (schemat 4.1).^{201,202}



Schemat 4.1: Propozycja metody wprowadzania ugrupowania elektrofilowego do struktury inhibitorów gingipain oraz rozbudowy ich części Pn' w oparciu o chemię azapeptydów

W pierwszym etapie przygotowuje się prekursor fragmentu Pn-P2. Reszta C-końcowa jest w tym przypadku estrem metylowym, który przekształca się w hydrazyd w reakcji z hydrazyną. Taki fragment modyfikuje się następnie odpowiednim bromkiem alkilu, prekursorem łańcucha bocznego reszty P1. Otrzymany związek sprzęga się następnie z aktywowanym kwasem, do którego struktury

wbudowano reaktywne ugrupowanie elektrofilowe (docelowo miejsce ataku katalitycznej reszty cysteiny enzymu) oraz zaprojektowany fragment P1'-Pn'.

Rozwiązanie to ma dwie główne zalety. Po pierwsze, niejednokrotnie kłopotliwe otrzymanie fragmentu odpowiedzialnego za utworzenie wiązania kowalencyjnego z centrum aktywnym enzymu jest w tym wypadku oddzielnym etapem przeprowadzanym na mniej złożonych układach (np. odpowiednio podstawiona reszta kwasu fumarowego czy epoksybursztynowego). Konsekwencją uproszczenia tego etapu jest większa elastyczność w doborze reszt Pn', co w perspektywie rozszerza wachlarz możliwości modyfikacji tej części liganda. Po drugie, połączenie fragmentów Pn i Pn' w przypadku pochodnych, w których docelowo w pozycji P1 pojawia się „aza-analog” właściwego aminokwasu, jest realizowane w dość zachowawczych warunkach. Stosuje się tutaj sprzęganie z użyciem benzotriazolowych środków sprzęgających. Jest to metoda dobrze tolerowana przez wiele grup funkcyjnych włączonych do struktury różnych skutecznych inhibitorów proteaz cysteinowych (np. fragment epoksybursztynianu czy fumaranu).

5 Przepisy preparatywne

Metody analityczne

5.1 Synteza halometyloketonów pochodnych Lys i Arg

5.1.1 Otrzymywanie Boc-NHLys(Z)-CHN₂

5.1.2 Otrzymywanie chlorometyloketonów, pochodnych lizyny

5.1.3 Wprowadzanie podstawnika P2. Przepisy ogólne stosowane przy acylowaniu Boc-Lys-(Cbz)-CH₂Cl chlorkami kwasowymi lub mieszanymi bezwodnikami

5.1.3.1 Metoda A, acylowanie chlorkami kwasowymi

5.1.3.2 Metoda B, acylowanie metodą mieszanych bezwodników

5.1.3.3 Dane analityczne dotyczące *N*-acylowanych chlorometyloketonowych pochodnych lizyny

5.1.4 Przepis ogólny dotyczący usuwania grup ochronnych Cbz z atomów azotu grupy funkcyjnej łańcucha bocznego lizyny oraz grup aminowych reszt P2 i P3 pochodnych lizynowych oraz dane analityczne dla otrzymanych chlorometyloketonów

5.1.5 Chlorometyloketony – pochodne argininy

5.1.5.1 Otrzymywanie Boc-Arg(Z)₂-CHN₂

5.1.5.2 Otrzymywanie chlorometyloketonu argininy, jego *N*-acylowanych pochodnych oraz ich deprotekcji

5.1.5.3 Dane analityczne dla chlorometyloketonów – pochodnych argininy

5.1.6 Bromometyloketony – pochodne lizyny i argininy

5.2 Pochodne otrzymywane z *N*-acylowanych bromometyloketonów lizyny i argininy

5.2.1 Acyloksymetyloketony

5.2.1.1 Fenylopropionylo-Lys(Z)-CH₂OC(O)-2,6-di-(trifluorometylo)benzen

5.2.1.2 Fenylopropionylo-Arg-(Z)₂-CH₂OC(O)-2,6-di-(trifluorometylo)benzen

5.2.1.3 Fenylopropionylo-Lys-CH₂OC(O)-2,6-di(trifluorometylo)benzen

5.2.2 Oksirany

5.2.2.1 3-Fenylopropionylo-Lys(Z)-oksyran

5.2.2.2 Fenylopropionylo-Arg(Z)₂-oksyran

5.3 Synteza α,β -nienasyconych pochodnych lizyny i argininy

5.3.1 Synteza prekursorów aldehydowych

5.3.1.1 Otrzymywanie *N*-acylowanych estrów lizyny i argininy

5.3.1.2 3-Fenylopropionylo-Lys(Cbz)-H (22a, sposób I)

5.3.1.3 Otrzymywanie aldehydów z odpowiednich alkoholi

5.3.1.3.1 Otrzymywanie alkoholi z *N*-acylowanych estrów

5.3.1.3.2 Utlenianie alkoholi do aldehydów

5.3.1.4 Otrzymywanie aldehydu poprzez redukcję amidu Weinreb'a

5.3.2 Otrzymywanie α,β -nienasyconych amidów z odpowiednich kwasów uzyskanego przez hydrolizę estrów zsyntezowanego w oparciu o reakcję Wittiga

5.3.2.1 Ester metylowy kwasu (*E*)-8-*N*-benzyloksykarbonyloamino-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego

5.3.2.2 Kwas (*E*)-8-*N*-benzyloksykarbonyloamino-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowy

5.3.2.3 Ester metylowy kwasu 7-(2,3-dibenzyloksykarbonyloguanidyno)-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]hept-2-enowego (31) oraz produkt jego odblokowania

5.3.2.4 Przygotowanie 4-*N*-benzyloksykarbonylofenylenodiaminy, prekursora reszty P1' amidowych akceptorów typu Michael'a

4-*N*-benzyloksykarbonylofenylenodiaminy

5.3.2.5 *N*-[4-*N'*-(benzyloksykarbonylo)fenylo]amid kwasu

- 8-(*N*-benzylloksykarbonylo)-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego (sposób 1)
- 5.3.2.6 *N*-[4-*N'*-(benzylloksykarbonyloamino)fenylo]amid kwasu
- 8-(*N*-benzylloksykarbonylo)-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]-okt-2-enowego (sposób 2)
- 5.3.3 Olefinacja w oparciu o reakcję HWE
- 5.3.3.2 *N*-[4-*N'*-(benzylloksykarbonylo)amino]fenyloamid kwasu
- 8-(*N*-benzylloksykarbonylo)-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego (sposób 3)
- 5.3.3.3 *N*-[4-*N'*-(benzylloksykarbonylo)amino]fenyloamid kwasu
- 8-benzylloksykarbonyloamino-4-{[4-(*N*-benzylloksykarbonyloaminometylo)fenylo-acetylo]amino}okt-2-enowego
- 5.3.3.4 *N*-[4-*N'*-(benzylloksykarbonylo)amino]fenyloamid kwasu
- 8-(*N*-benzylloksykarbonylo)-4-(*N*-benzoiloamino)okt-2-enowego
- 5.3.3.5 *N*-[4-*N'*-(benzylloksykarbonylo)fenylo]amid kwasu
- 7-(2,3-dibenzylloksykarbonyloguanidyno)-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]hept-2-enowego
- 5.3.4 Odblokowanie końcowych grup aminowych otrzymanych pochodnych α,β -nienasyconych – dane analityczne
- 5.3.4.1 Ester metylowy kwasu (*E*)-8-amino-4-[(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego
- 5.3.4.2 *N*-(4-aminofenylo)amid kwasu (*E*)-8-amino-4-[(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego
- 5.3.4.3 *N*-(4-aminofenylo)amid kwasu (*E*)-8-amino-4-{[4-(aminometylo)fenyloacetylo]amino}okt-2-enowego
- 5.3.4.4 Produkt (39) wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji *N*-(4-aminofenylo)amidu kwasu 8-amino-4-(*N*-benzoiloamino)okt-2-enowego
- 5.3.4.5 *N*-(4-Aminofenylo)amid kwasu (*E*)-7-guanidyno-4-[(3-fenylopropionylo)amino]hept-2-enowego oraz produkt jego wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji

5.4 Synteza pochodnych γ -okso- α,β -nienasyconych

- 5.4.1 Addycja prekursora reszty P1' do sililowego eteru enolowego (ścieżka II)
- 5.4.2 Reakcja HWE między oksoaldehydem i karboanionem otrzymywanym z fosfonoamidowego prekursora reszty P1' (ścieżka III)
 - 5.4.2.1 Przygotowanie acetonowego roztworu dimetylodioksiranu
 - 5.4.2.2 3-Fenylopropionylo-Lys(Cbz)-CHN₂
 - 5.4.2.3 7-*N*-benzylloksykarbonyloamino-2-okso-3-[(3-fenylopropionylo)amino]-heptanal
- 5.4.3 Reakcja HWE między karboanionem otrzymywanym z β -ketofosfonianu i oksoaldehydowym prekursorem reszty P1' (ścieżka IV, sposób 1)
 - [4-(*N*-benzylloksykarbonyloamino)fenyloamino]etanal (I)
 - 5.4.3.7 6-(2,3-dibenzylloksykarbonyloguanidyno)-2-okso-3-(3-fenylpropanoamido)heksylofosfonian dimetylu
- 3.4.4 Reakcja HWE między karboanionem otrzymywanym z β -ketofosfonianu i glioksalanem etylu (ścieżka IV, sposób 2)
 - 3.4.4.1 Ester etylowy kwasu 9-*N*-benzylloksykarbonyloamino-4-okso-5-(*N*-(3-fenylopropionylo)amino)non-2-enowego
 - 5.4.4.2 Ester etylowy kwasu 5-[*N*-(benzoilo)amino]-9-*N*-benzylloksykarbonyloamino-4-okso-non-2-enowego
 - 5.4.4.3 Ester etylowy kwasu 8-(2,3-dibenzylloksykarbonyloguanidyno)-4-oxo-5-(*N*-(3-fenylopropionylo)amino)okt-2-enowego
 - 3.4.4.4 Usuwanie grup ochronnych z otrzymanych γ -okso- α,β -nienasyconych estrów

Metody analityczne

- Widma ^1H NMR oraz ^{31}P NMR rejestrowano przy pomocy spektrometru Bruker DRX (odpowiednio 300,13 MHz i 121,51 MHz).
- Widma $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, ^{13}C NMR, DEPT135, HSQC oraz HMBC rejestrowano przy pomocy spektrometru BRUKER AVANCE II Ultrashield Plus 600 MHz wykorzystując dostarczone przez producenta standardowe programy pulsów (częstotliwość podstawowa dla ^1H NMR 600,58 MHz, a dla ^{13}C NMR 151,03 MHz).
- Sygnały na widmach ^1H NMR oraz ^{13}C NMR zostały przypisane jednoznacznie na podstawie odpowiednich widm korelacyjnych.
- Widma IR rejestrowano przy pomocy spektrometru Perkin Elmer System 2000 FT.
- Temperatury topnienia oznaczano używając mikroskopu Boetius'a z gorącym stolikiem. Oznaczone wartości nie były korygowane.
- Analiza elementarna chlorometyloketonów została wykonana na aparacie Elementar vario EL III w Laboratorium Analizy Instrumentalnej Uniwersytetu Wrocławskiego.
- Chromatografię cienkowarstwową wykonywano stosując gotowe płytki chromatograficzne pokryte silikazelem 60 (Merck). Chromatografię kolumnową prowadzono używając silikazelu 60, 70-230 mesh (Merck).
- Reakcje wymagające temperatur poniżej $-60\text{ }^\circ\text{C}$ prowadzono w atmosferze azotu, w łaźni alkoholowej (naczyniu Dewara) chłodzonej kriostatem Julabo FT 901.
- Do syntezy związków używano odczynników handlowych (Merck, Fluka, Aldrich, Novabiochem). Zastosowane środki suszące i rozpuszczalniki o czystości analitycznej pochodziły z POCh.
- Rozpuszczalniki handlowe stosowane do reakcji w warunkach bezwodnych osuszano i redestylowano.

Acetonitryl o czystości analitycznej (HPLC) destylowano z użyciem kolumny Vigroux znad P_2O_5 .

Dichlorometan destylowano z użyciem kolumny Vigroux znad P_2O_5 . Destylat zbierano w 40 °C.

Destylację tetrahydrofuranu prowadzono w atmosferze azotu. 600 ml THF oraz po 3g metalicznego potasu i benzofenonu wprowadzono do kolby okrągłodennej (1000ml) i ogrzewano do momentu zabarwienia się cieczy na granatowo. Następnie otwierano wypływ do odbieralnika wypełnionego sitami molekularnymi i zbierano destylat o temperaturze wrzenia 65-66 °C.

- Chloromrówczan izobutyli, chlorek tionyli oraz trietyloamina były destylowane przed użyciem.
- Wybrane pochodne blokowane Cbz oraz wszystkie pochodne po usunięciu grup ochronnych oczyszczano przy pomocy HPLC używając aparatu Varian ProStar 210 z detektorem ProStar 325 UV/Vis na kolumnie Dynamax 250 _ 21.4 Microsorb 300-10 C18.
- Czystość pochodnych wydzielonych z mieszanin po usuwaniu grup ochronnych Cbz oceniano przy pomocy sytemu j/w stosując kolumnę analityczną 250 _ 4.6 Microsorb-MV 100-5 C18.
- Chromatografię na odwróconej fazie prowadzono we wzrastającym gradiencie acetonitrylu w wodzie. Używane rozpuszczalniki zakwaszono TFA (0,1 % objętościowo).

5.1 Synteza halometyloketonów pochodnych Lys i Arg

5.1.1 Otrzymywanie Boc-NHLys(Z)-CHN₂ (3)

Związek **3** otrzymano w reakcji BocHNLys(Z)OH (**1**) metodą mieszanych bezwodników w reakcji z diazometanem generowanym z diazaldu (*N*-metylo-*N*-nitrozoamid kwasu *p*-toluenosulfonowego CH₃C₆H₄SO₂N(CH₃)NO₂). W umieszczonej na mieszadle magnetycznym, w łaźni alkoholowej chłodzonej kriostatem trójzwyjnej kolbie okrągłodennej zaopatrzonej we wkraplacz i połączonej z układem do destylacji prostej zabezpieczonym przed dostępem wilgoci, umieszczono 70 ml roztworu 20,0 mmol (7,60 g) **1** w bezwodnym THF. Po schłodzeniu roztworu do -20 °C do kolby wprowadzono 25,0 mmoli (2,75 ml) *N*-metylomorfoliny (NMM). Po 5 minutach mieszania do mieszaniny reakcyjnej wkroplono 24,0 mmol (3,12 ml) chloromrówczanu izobutyli. Reakcję prowadzono przez kolejne 45 minut przygotowując równolegle eterowy roztwór diazometanu. Do 180,00 ml chłodzonego w łaźni lodowej eterowego roztworu 40 mmol (8,56 g) diazaldu wkroplono 10,00 ml alkoholowego roztworu 40 mmoli (2,63 g, 85%) KOH i kontynuowano mieszanie przez 30 minut. Następnie roztwór wygenerowanego diazometanu przeniesiono przy pomocy strzykawki przez septę do kolby destylacyjnej i oddestylowano do kolby z otrzymanym mieszanym bezwodnikiem. Mieszanie w -20 °C kontynuowano kolejne 2 godziny od momentu przeddestylowania całej ilości otrzymanego diazometanu, a następnie kolbę z mieszaniną reakcyjną umieszczono na 22 godziny w wymrażarce (-20 °C). Po tym czasie odparowano nadmiar diazometanu i rozpuszczalnik. Surowy produkt **3** krystalizowano z octanu etylu wytrącając go heksanem. Produkt otrzymano w postaci drobnokrystalicznego osadu z wydajnością 82%.

5.1.2 Otrzymywanie chlorometyloketonów, pochodnych lizyny

Boc-NHLys(Z)-CH₂Cl (**5**)

Pochodną diazometinową przeprowadzano w chlorometyloketon przy pomocy roztworów HCl w rozpuszczalnikach organicznych. Stosowano 4 M HCl w dioksanie lub 7,5 M HCl w metanolu. Do roztworu diazoketonu **3** w bezwodnym THF

wprowadzano stechiometryczną ilość HCl w postaci nasyconego roztworu metanolowego lub dioksanowego. Obserwowano wydzielanie azotu, po jego ustaniu oczekiwano jeszcze kilka minut, po czym z mieszaniny odparowywano rozpuszczalnik. Końcowy produkt **5** rekrytalizowano z octanu etylu.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.41 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$); 1.50, 1.81 (m each, 3H and 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 3.18 (m, 2H, CH_2NH); 4.24 (s, 2H, CH_2Cl); 4.42 (m, 1H, CH); 4.84 (m, 1H, CH_2NH); 5.07 (s, 2H, PhCH_2O); 5.21 (m, 1H, CHNH); 7.28 (s, 5H, Ph).

5.1.3 Wprowadzanie podstawnika P2. Przepisy ogólne stosowane przy acylowaniu Boc-Lys-(Cbz)- CH_2Cl chlorkami kwasowymi lub mieszanymi bezwodnikami

5.1.3.1 Metoda A, acylowanie chlorkami kwasowymi

Wszystkie pochodne otrzymywano ze związku **5** przeprowadzając go uprzednio w chlorowoderek **7**. W tym celu rozpuszczano 2,0 mmole **5** w minimalnej ilości THF i mieszano z nadmiarem 7,5 M HCl w MeOH w 0 °C. Mieszanie w tej temperaturze kontynuowano przez 15 minut, po czym z mieszaniny odparowywano rozpuszczalnik do sucha otrzymując surowy chlorowoderek **7** w postaci gęstego oleju. Pozostałości HCl usuwano z otrzymanego oleju przez kilkukrotne odparowanie z bezwodnym THF. Surowy produkt zawieszano w 30 ml bezwodnego THF i do zawiesiny dodawano **5** milimoli NMM. Następnie kolbę z mieszaniną umieszczano w łaźni lód/woda ustawionej na mieszadle magnetycznym i po 5 minutach rozpoczynano wkraplanie 2,4 mmola chlorku kwasowego. Używano albo odczynnika handlowego, bądź produktu uzyskiwanego w reakcji odpowiedniego kwasu z SOCl_2 w dichlorometanie według standardowej procedury. (W przypadku chlorków otrzymywanych syntetycznie, surową mieszaninę po reakcji z chlorkiem tionylu odparowywano kilkakrotnie z bezwodnym benzenem do sucha i wówczas otrzymany chlorek stosowano bez dalszego oczyszczania). Mieszanie kontynuowano 24 godziny pozwalając na ogrzanie się mieszaniny do temperatury pokojowej. Po tym czasie z mieszaniny odparowywano THF, a pozostałość rozrabiano w mieszaninie 50 ml octanu etylu i 10 ml wody. Po przeniesieniu do rozdzielacza mieszanina była przemywana kolejno 5% NaHCO_3 , 2 \times 10% kwasem cytrynowym i solanką porcjami po 40 ml. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po oddzieleniu środka suszącego odparowywano

octan etylu i pozostałość oczyszczano na silikażelu stosując do elucji układy octan etylu-heksan. Otrzymane pochodne rekrytalizowano dodatkowo z octanu etylu.

5.1.3.2 Metoda B, acylowanie metodą mieszanych bezwodników

Odpowiednie kwasy aktywowano przeprowadzając je w mieszane bezwodniki w reakcji z chloromrówczanem izobutyłu (*i*-BuCOCl) w obecności aminy trzeciorzędowej. Kwas (2,0 mmol) rozpuszczano w 50 ml bezwodnego THF i do roztworu dodawano 0,55 ml (5,0 mmol) NMM. Kolbę z roztworem ustawiano na mieszadle magnetycznym w łaźni lód/woda i po pięciu minutach do roztworu dodawano *i*-BuCOCl (0,31 ml, 2,4 milimola). Mieszanie kontynuowano przez 45 minut w 0 °C. Po tym czasie do mieszaniny dodawano zawiesinę monochlorowodoru chlorometyloketonu lizyny **7** w bezwodnym THF otrzymanego z pochodnej *N*_α-tertbutyloksylowej zgodnie z procedurą opisaną w **metodzie A**. Po 24 godzinach mieszaninę przerabiano i rozdzielano analogicznie jak w reakcji z chlorkami kwasowymi.

5.1.3.3 Dane analityczne dotyczące *N*-acylowanych chlorometyloketonowych pochodnych lizyny

3-Fenylopropionilo-Lys(**Z**)-CH₂Cl (**9a**, metoda A)

Wydajność: 40%. T. t. 92-94 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.15 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.49, 1.71 (m każdy, 3H i 1H; CH₂CH₂CH₂CH); 2.43 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 2.87 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 3.08 (m, 2H, CH₂NH); 4.07 (s, 2H, CH₂Cl); 4.61 (m, 1H, CH); 4.75 (m, 1H, NH); 5.00 (s, 2H, PhCH₂O); 6.14 (bd, *J* = 5.5 Hz, 1H, NHCH); 7.04-7.29 (m, 10H, 2 × Ph).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3330, 3305 (NH); 3030, 2960, 2930 (CH); 1730, 1685, 1640 (C=O); 1530 (δNH); 1260 (C-O).

Anal. (C₂₄H₂₉ClN₂O₄) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 64.78, 6.57, 6.30; z anal. 64.50, 4.40, 6.03.

3-(4-Hydroksyfenylo)propionilo-Lys-(**Z**)-C(O)CH₂Cl (**9b**, metoda B)

Wydajność: 37%. T. t. 53-56 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.18, 1.34, 1.64 (m każdy, 1H, 3H i 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.34, 2.47 (m każdy, 1H i 1H, *p*-OH-C₆H₄CH₂CH₂); 2.81, 3.06 (m każdy, 3H i 1H, *p*-OHC₆H₄CH₂CH₂ i CH₂NH); 4.05 (s, 2H, CH₂Cl); 4.61 (m, 1H, CH); 4.78 (m, 1H, NH);

5.04 (s, 2H, PhCH₂O); 5.90 (bd, *J* = 5.3 Hz, 1H, NHCH); 6.70, 6.96 (d każdy, 2H i 2H; C₆H₄); 7.27 (m, 5H, Ph).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3390, 3320 (NH); 3065, 2930 (CH); 1735, 1690, 1650 (C=O); 1530, 1515 (δNH); 1255 (C-O).

Anal. (C₂₄H₂₉ClN₂O₅) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 62.54, 6.34, 6.08; z anal. 62.73, 6.31, 6.22.

Z-GABA-Lys(Z)-CH₂Cl (9c, metoda B)

Wydajność: 50%. T. t. 118-120 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.34-1.75 (m, 8H, CH₂CH₂CH₂CH i CH₂CH₂CH₂GABA); 2.16 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CO); 3.13 (m, 4H, 2 × CH₂NH); 4.18 (s, 2H, CH₂Cl); 4.63 (m, 1H, CH); 4.93 (m, 2H, 2 × NH); 5.00 (s, 4H, 2 × PhCH₂O); 6.75 (m, 1H, NHCH); 7.36 (m, 10H, 2 × Ph).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3320, 3270 (NH); 3065, 2930, 2860 (CH); 1735, 1690, 1645 (C=O); 1545 (δNH); 1275 (CO).

Anal. (C₂₇H₃₄ClN₃O₆) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 60.95, 44.6, 7.90; z anal. 60.96, 6.45, 7.78.

4-(N-Benzylloksykarbonylaminometylo)fenyloacetylo-Lys(Z)-CH₂Cl (9d, metoda A)

Ponieważ kwas wzięty do przygotowania chlorku używanego w syntezie **9d** nie jest dostępny handlowo, otrzymano go z kwasu 4-bromometylofenylooctowego. 5,00 g (20,2 mmol) tego kwasu dodano do 100 ml nasyconego roztworu amoniaku w metanolu i mieszano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie rozpuszczalnik był odparowany do sucha, a pozostałość potraktowano 2M wodnym roztworem NaOH. Pozostałości amoniaku odparowano. Otrzymaną mieszaninę rozpuszczono w 60 mL roztworu woda / dioksan (1:1) i wkraplano do niej chloromrówczan benzylu (3,50 g, 20,5 mmol) utrzymując pH około wartości 10 poprzez dodawanie 2M wodnego roztworu NaOH. Po 12 godzinach mieszania, roztwór przemyto eterem dietylowym (2 × 50 ml). Następnie fazę wodną zakwaszono przy pomocy 1M HCl do pH 1 i odsączono wytracający się osad. Surowy produkt zrekrytalizowano w układzie octan etylu/heksan otrzymując 4,70 g (wydajność 71%) kwasu 4-[(N-benzylloksykarbonylo)aminometylo]-fenylooctowego. Przeprowadzono go następnie w chlorek kwasowy metodą z SOCl₂, tak jak opisano wyżej. Po kilkukrotnym odparowaniu z suchym benzenem używano go w reakcji acylowania (**metoda A**) bez dodatkowego oczyszczania.

Wydajność: 40%. T. t. 129-133 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.27 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.67, 1.85 (m każdy, 3H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 3.13 (m, 2H, CH₂NH); 3.56 (s, 2H, CH₂CONH); 4.21 (s, 2H, CH₂Cl); 4.38 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, C₆H₄CH₂N); 4.74 (m, 1H, CH); 4.85 (m, 1H, NH); 5.10, 5.15 (s każdy, 2H i 2H, 2 × PhCH₂O); 5.26 (m, 1H, NH); 6.20 (bd, *J* = 7.0 Hz, 1H, NHCH); 7.22-7.36 (m, 14H, 2 × Ph and C₆H₄). IR (KBr, cm⁻¹): ν 3320 (NH); 3060, 3030, 2930, 2860 (CH); 1735, 1690, 1650 (C=O); 1530, 1455 (δNH); 1255 (C-O). Anal. (C₃₂H₃₆ClN₃O₆) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 64.69, 6.11, 7.07; z anal. 64.53, 5.93, 6.99.

Boc-Phe-Lys(Z)-CH₂Cl (9e, metoda B)

Wydajność: 49%. T. t. 149-151 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.25 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.43 (s, 9H, (CH₃)₃C); 1.49, 1.81 (m każdy, 3H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 3.01 (m, 2H, PhCH₂); 3.10 (m, 2H, CH₂NH); 4.04 (s, 2H, CH₂Cl); 4.34, 4.65 (m każdy, 1H i 1H, 2 × CH); 4.95 (bs, 1H, NH); 5.16 (m zawierający układ AB, *J* = 12.1 Hz, 3H, PhCH₂O and NH); 6.62 (bd, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH); 7.14-7.33 (m, 10H, 2 × Ph). IR (KBr, cm⁻¹): ν 3325 (NH); 3065, 3035, 2970, 2940 (CH); 1740, 1685, 1650 (C=O); 1535, 1520 (δNH); 1265, 1250, 1170 (C-O). Anal. (C₂₉H₃₈ClN₃O₆) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 62.19, 6.84, 7.50; z anal. 61.33, 6.67, 7.30.

Benzoilo-Lys(Z)-CH₂Cl (9f, metoda A)

Wydajność: 50%. T. t. 123-125 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.49 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.55, 1.83, 2.00 (m każdy, 2H, 1H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 3.23 (m, 2H, CH₂NH); 4.35 (s, 2H, CH₂Cl); 4.99-5.10 (m, 4H, CH, NH i PhCH₂O); 7.10 (bd, *J* = 5.3 Hz, 1H, NHCH); 7.30-7.89 (m, 10H, 2 × Ph). IR (KBr, cm⁻¹): ν 3330, 3280 (NH); 3065, 2930 (CH); 1740, 1690, 1640 (C=O); 1550, 1530 (δNH); 1265 (C-O). Anal. (C₂₂H₂₅ClN₂O₄) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 63.38, 6.04, 6.72; z anal. 63.66, 5.75, 6.86.

5.1.3.4 Związki zawierające podstawnik P3, P3-Phe-Lys(Z)-CH₂Cl

Chlorometyloketony mające docelowo oddziaływać dodatkowo z wnęką S3 Kgp otrzymywano poprzez acylowanie dipeptydowej pochodnej 9e metodą mieszanych bezwodników po wcześniejszym odblokowaniu grupy N_α-aminowej reszty

fenyloalanylowej. Procedury usuwania grupy ochronnej Boc oraz acylowania są takie same jak w przypadku pochodnych dipeptydowych.

Boc-Phe-Phe-Lys(Z)-CH₂Cl (14a, metoda B)

Wydajność: 60%. T. t. 149-151 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.22 (s, 9H, (CH₃)₃C); 1.39 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.50, 1.77 (m każdy, 2H i 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.87 (m, 2H, PhCH₂); 2.98-3.10 (m, 4H, CH₂NH i PhCH₂); 4.08 (s, 2H, CH₂Cl); 4.15, 4.46, 4.55 (m każdy, 1H, 1H i 1H, 3 × CH); 4.70 (bs, 1H, NH); 5.02 (układ AB, J = 12.0 Hz, 2H, PhCH₂O); 6.33 (bd, J = 7.5 Hz, 1H, NHCH); 6.69 (bs, 1H, NHCH); 6.96-7.26 (m, 15H, 3 × Ph).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3320, 3300 (NH); 3065, 3030, 2930 (CH); 1740, 1690, 1645 (C=O); 1530 (δNH); 1265, 1170 (C-O).

Anal. (C₃₈H₄₇ClN₄O₇) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 64.53, 6.70, 7.92; z anal. 63.98, 6.71, 7.74.

3-Pirydylokarboksylo-Phe-Lys(Z)-CH₂Cl (14b, metoda A)

Wydajność: 44%. T. t. 120-127 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.22 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.41, 1.80 (m każdy, 3H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 3.02 (m, 2H, PhCH₂); 3.16 (m, 2H, CH₂NH); 4.02 (s, 2H, CH₂Cl); 4.61 (m, 1H, CH); 4.86-5.06 (m, 4H, CH, NH i PhCH₂O); 6.66 (bs, 1H, NHCH); 6.84 (bs, 1H, NHCH); 7.20 (m, 10H, 2 × Ph); 7.44 (m, 1H, H₅ pirydyl); 7.77 (m, 2H, H₄ and H₆ pirydyl); 8.14 (s, 1H, H₂ pirydyl).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3315 (NH); 3135, 3030, 2930, 2860 (CH); 1740, 1645, 1615 (C=O); 1540 (δNH); 1270 (C-O).

Anal. (C₃₀H₃₃ClN₄O₅) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 63.77, 5.89, 9.92; z anal. 63.16, 5.80, 9.74.

2-Naftoilo-Phe-Lys(Z)-CH₂Cl (14c, metoda A)

Wydajność: 56%. T. t. 140-143 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.27 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.47, 1.51, 1.84 (m każdy, 2H, 1H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 3.05-3.20 (m, 4H, PhCH₂ and CH₂NH); 4.07 (s, 2H, CH₂Cl); 4.67, 4.89 (m każdy, 1H i 1H, 2 × CH); 5.05 (m, 3H, NH i PhCH₂O); 6.77 (bd, J = 6.5 Hz, 1H, NHCH); 7.06 (bd, J = 6.8 Hz, 1H, NHCH); 7.27, 8.00, 8.67, 8.91 (m, d, s, s, J = 7.4 Hz, 14H, 1H, 1H i 1H, 2 × Ph i naftyl).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3335, 3280 (NH); 3035, 2940 (CH); 1745, 1680, 1665, 1635 (C=O); 1530 (δNH); 1265 (C-O).

Anal. (C₃₅H₃₆ClN₃O₅) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 68.45, 5.91, 6.84; z anal. 68.48, 5.86, 7.35.

5.1.4 Przepis ogólny dotyczący usuwania grup ochronnych Cbz z atomów azotu grupy funkcyjnej łańcucha bocznego lizyny oraz grup aminowych reszt P2 i P3 pochodnych lizynowych oraz dane analityczne dla otrzymanych chlorometyloketonów

Reszty benzyloksykarbonylowe z grup aminowych usuwano kwasem trójfluorooctowym (TFA) w obecności anizolu.

Do kolby o objętości 25 ml ustawionej na mieszadle magnetycznym odważano 0,1 mmol pochodnej do odblokowania, dodawano 200 μ l anizolu oraz 2,0 ml TFA. Całość szczelnie zamykano i mieszano przez 24 godziny. Następnie z mieszaniny odparowywano TFA, a pozostałość traktowano mieszaniną 1 ml eteru dietylowego i 1 ml wody dejonizowanej. Warstwy rozdzielano i organiczną ekstrahowano 2 porcjami po 1 ml wody dejonizowanej. Roztwór wodny przemywano pięciokrotnie eterem. Po ostatnim przemyciu, ślady eteru z warstwy wodnej usuwano na wyparce rotacyjnej w temperaturze pokojowej. Roztwór wodny zagęszczano i наносono na preparatywną kolumnę do wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze złożem C18. Po ustaleniu warunków rozdziału składniki mieszaniny separowano techniką HPLC na odwróconej fazie we wzrastającym gradiencie acetonitrylu w wodzie. Poszczególne frakcje były zagęszczane, liofilizowane przy ciśnieniu 1 mmHg w temperaturze -60 $^{\circ}$ C, a następnie analizowane przy pomocy spektroskopii rezonansu magnetycznego. Czystość otrzymanych tą metodą próbek potwierdzano w dodatkowym eksperymencie z użyciem analitycznego HPLC na odwróconej fazie, analizując wybrane frakcje w dwóch różnych gradientach. Próbki zakwalifikowane do dalszych badań były liofilizowane i przechowywane w -20 $^{\circ}$ C

3-Fenylopropionylo-Lys-CH₂Cl (11a)

HPLC: $t_R = 15.5$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 10%; 5' – 20%; 7' – 40%; 23' – 70%.

¹H NMR (D₂O, ppm): δ 1.11 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.33, 1.47 (m każdy, 3H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.54 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 2.75 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 2.91 (m, 2H, CH₂NH₂); 4.15 (s, 2H, CH₂Cl); 4.31 (m, 1H, CH); 7.29 (m, 5H, Ph).

3-(4-Hydroksyfenylo)propionylo-Lys-CH₂Cl (11b)

HPLC: $t_R = 15.5$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 10%; 5' – 20%; 7' – 35%; 23' – 70%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 0.99 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.25, 1.44 (m każdy, 3H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.54 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $p\text{-OHC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.85 (m, 4H, $p\text{-OHC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2$ and CH_2NH_2); 4.13 (układ AB, $J = 17.0$ Hz, 2H, CH_2Cl); 4.27 (dd, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 4.3$ Hz, 1H, CH); 6.78, 7.16 (m każdy, 2H i 2H, C_6H_4).

GABA-Lys- CH_2Cl (11c)

HPLC: $t_R = 9.5$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 10%; 17' – 15%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.39, 1.61, 1.87 (m each, 2H, 3H and 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ i $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{GABA}$); 2.38 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2CONH); 2.94 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{NH}_2$); 4.50 (s, 2H, CH_2Cl); 4.55 (m, 1H, CH).

4-(Aminometylo)fenyloacetylo-Lys- CH_2Cl (11d)

HPLC: $t_R = 14.7$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 10%; 17' – 20%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.32 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.57, 1.84 (m każdy, 3H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.86 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2NH_2); 3.60 (s, 2H, CH_2CONH); 4.08 (s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{N}$); 4.40 (s, 2H, CH_2Cl); 4.49 (m, 1H, CH); 7.31 (m, 4H, C_6H_4).

Phe-Lys- CH_2Cl (11e)

HPLC: $t_R = 19.7$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 10%; 14' – 25%; 25' – 40%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.65, 2.30 (m każdy, 5H i 1H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.66 (m, 2H, PhCH_2); 2.95 (m, 2H, CH_2NH_2); 4.13 (s, 2H, CH_2Cl); 4.70 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$); 7.31 (m, 5H, Ph).

Benzoilo-Lys- CH_2Cl (11f)

HPLC: $t_R = 14.0$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 10%; 5' – 20%; 7' – 40%; 22' – 65%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.43 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.62, 1.71, 1.95 (m każdy, 2H, 1H and 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2NH_2); 4.53 (układ AB, $J = 17.0$ Hz, 2H, CH_2Cl); 4.83 (m, 1H, CH); 7.44, 7.56, 7.69 (m każdy, 2H, 1H i 2H, Ph).

Phe-Phe-Lys- CH_2Cl (15a)

HPLC: $t_R = 16.8$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 10%; 14' – 35%; 20' – 50%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.22 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.61, 1.80 (m każdy, 3H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.91 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, CH_2NH_2); 2.98-3.19 (m, 4H, $2 \times \text{PhCH}_2$); 4.00 (układ AB, $J = 17, 2$ Hz, CH_2Cl); 4.21, 4.27, 4.51 (m każdy, 1H, 1H i 1H, $3 \times \text{CH}$); 7.21-7.34 (m, 10H, $2 \times \text{Ph}$).

3-Pirydylokarboksy-Phe-Lys- CH_2Cl (15b)

HPLC: $t_R = 16.0$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 25%; 7' – 75%; 14' – 90%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.25 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.51, 1.75 (m każdy, 3H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.73 (m, 2H, CH_2NH_2); 3.20 (m, 2H, PhCH_2); 4.03-4.38 (m, 3H, CH_2Cl i CH); 4.72 (m, 1H, CH); 7.19-7.95 (m, 9H, Ph i pirydyl).

2-Naftoilo-Phe-Lys- CH_2Cl (15c)

HPLC: $t_R = 11.0$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 18%; 18' – 70%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.18 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.60, 1.83 (m każdy, 3H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.81 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2NH_2); 3.09 (m, 2H, PhCH_2); 4.12, (układ AB, $J = 17.0$ Hz, 2H, CH_2Cl); 4.38, 4.78 (m każdy, 1H i 1H, $2 \times \text{CH}$); 7.22, 8.06, 8.75, 8.83, 8.99 (m każdy, 8H, 1H, 1H, 1H i 1H, Ph i naftyl).

5.1.5 Chlorometyloketony – pochodne argininy

5.1.5.1 Otrzymywanie Boc-Arg(Z) $_2$ - CHN_2 (4)

Do otrzymywania tytułowego związku zastosowano procedurę opisaną dla pochodnej lizynowej **3**. Mieszany bezwodnik otrzymano w reakcji Boc-Arg-(Z) $_2$ -COOH z chloromrówczanem izobutyli w obecności NMM. Wzięto odpowiednio 20,0 mmol (10,85 g) **2**, 25,0 mmol (2,75 ml) NMM oraz 24,0 mmol (3,12 ml) chloromrówczanu izobutyli. Diazometan generowano z 40,0 milimoli (8,56 g) diazaldy rozpuszczonego w 180 ml eteru dietylowego przy użyciu roztworu 2,64 g 85% KOH w 15 ml alkoholu etylowego. Produkt w postaci jasnożółtych kryształów otrzymano z wydajnością 90%.

5.1.5.2 Otrzymywanie chlorometyloketonu argininy, jego *N*-acylowanych pochodnych oraz ich deprotekcji

Synteza opisanych wyżej chlorometyloketonów lizynowych i ich argininowych analogów przebiegała według tego samego schematu. Procedury zastosowane w obu przypadkach różniły się tylko w trzech punktach. Po pierwsze, usunięcie grupy ochronnej Boc z BocArg(Z) $_2$ C(O)CH $_2$ Cl poprzedzające acylowanie wymagało dłuższego czasu – 40 minut. Po drugie do odblokowania grup aminowych chronionych resztą benzyloksyformylową używano mieszaniny TFA i tioanizolu, ale w takich samych proporcjach jak TFA i anizolu dla pochodnych lizyny. I wreszcie, czas potrzebny w tym wypadku do całkowitej konwersji substratu był dwukrotnie dłuższy (48 godzin).

5.1.5.3 Dane analityczne dla chlorometyloketonów – pochodnych argininy

Boc-Arg(Z)₂-CH₂Cl (6)

Wydajność: 91%.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.45 (s, 9H, (CH₃)₃C); 1.58, 1.90 (m każdy, 3H i 1H, CH₂CH₂CH); 3.46 (m, 2H, CH₂NH); 4.16 (s, 2H, CH₂Cl); 4.24 (m, 1H, CH); 5.09 (bd, *J* = 6.0 Hz, 1H, NHCH); 5.15, 5.21 (s each, 2H and 2H, 2 × PhCH₂O); 7.34 (m, 10H, 2 × Ph); 8.34, 11.77 (bs każdy, 1H i 1H, 2 × NH).

3-Fenylopropionylo-Arg(Z)₂-CH₂Cl (10a, metoda A)

Wydajność: 52%. T. t. 113-115 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm) δ 1.43 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.70 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 2.34 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 2.85 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 3.57, 3.64 (m każdy, 1H i 1H, CH₂NH); 4.09 (układ AB, *J* = 15.5 Hz, 2H, CH₂Cl); 4.59 (m, 1H, CH); 5.13 (układ AB, *J* = 12.0 Hz, 2H, PhCH₂O); 5.27 (s, 2H, PhCH₂O); 7.09-7.43 (m, 16H, 3 × Ph i NHCH), 9.37, 9.53 (bs każdy, 1H i 1H, 2 × NH).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3390, 3260 (NH); 3065, 3030, 2960, 2930 (CH); 1720, 1650, 1625, 1610 (C=O); 1510 (δNH); 1260 (C-O).

Anal. (C₃₂H₃₅ClN₄O₆) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 63.31, 5.81, 9.23; z anal. 63.06, 5.44, 9.26.

3-(4-Hydroksyfenylo)propionylo-Arg(Z)₂-CH₂Cl (10b, metoda B)

Wydajność: 37%. T. t. 142-143°C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.33 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.59 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 2.29 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, *p*-OH-C₆H₄CH₂CH₂); 2.76 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, *p*-OH-C₆H₄CH₂CH₂); 3.68 (m, 2H, CH₂NH); 4.05 (układ AB, *J* = 15.5 Hz, 2H, CH₂Cl); 4.48 (m, 1H, CH); 5.13, 5.23 (s każdy, 2H i 2H, 2 × PhCH₂O); 6.65, 6.78 (d każdy, *J* = 7.7 Hz, 2H i 2H, C₆H₄); 5.39 (bd, *J* = 7.4 Hz, 1H, NHCH); 7.35 (m, 10H, 2 Ph); 9.37, 9.49 (bs każdy, 1H i 1H, 2 × NH).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3395, 3270 (NH); 3065, 3035, 2960, 2935 (CH); 1725, 1645, 1610 (C=O); 1535, 1515 (δNH); 1255 (C-O).

Anal. (C₃₂H₃₅ClN₄O₇) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 61.68, 5.66, 8.99; z anal. 61.86, 5.45, 8.68.

Z-GABA-Arg(Z)₂-CH₂Cl (10c, metoda B)

Wydajność: 49%. T. t. 142-144 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.53-1.70 (m, 6H, CH₂CH₂CH i CH₂CH₂CH₂GABA); 1.95 (m, 2H, CH₂COGABA); 3.03 (m, 2H, CH₂NHGABA), 3.72 i 3.89 (m każdy, 1H i 1H, CH₂NH); 4.03 (układ AB, *J* = 16,2 Hz, 2H, CH₂Cl); 4.55 (m, 1H, CH); 4.85 (m, 1H,

NH); 5.04, 5.05, 5.16 (s każdy, 2H, 2H i 2H, 3 × PhCH₂O); 7.30 (m, 15H, 3 × Ph); 7.45 (bd, *J* = 7.1 Hz, 1H, **NHCH**); 9.27, 9.42 (bs każdy, 1H i 1H, 2 × **NH**).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3385, 3320 (**NH**); 3065, 3035, 2965, 2940 (**CH**); 1735, 1720, 1690, 1640 (C=O); 1535, 1505 (δ**NH**); 1260 (C-O).

Anal. (C₃₅H₄₀ClN₅O₈) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 60.56, 5.81, 10.09; z anal. 60.68, 5.66, 10.02.

4-(*N*-Benzyloksykarbonyloaminometylo)fenyloacetylo-Arg(*Z*)₂-CH₂Cl (10d, metoda A)

Wydajność: 45%. T. t. 118-120 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.55 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.75 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 3.33 (układ AB, *J* = 15.2 Hz, CH₂CONH); 3.66, 3.83 (m każdy, 1H i 1H, CH₂NH); 4.11 (układ AB, *J* = 16.0 Hz, 2H, CH₂Cl); 4.34 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, NCH₂C₆H₄); 4.57 (m, 1H, **CH**); 5.12, 5.15, 5.23 (s każdy, 2H, 2H i 2H, 3 × PhCH₂O); 5.17 (bs, 1H, **NH**); 7.08, 7.18 (d każdy, *J* = 7.5 Hz, 2H i 2H, C₆H₄); 7.38 (m, 16H, 3 × Ph and **NHCH**); 9.32, 9.47 (bs każdy, 1H i 1H, 2 × **NH**).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3390, 3300 (**NH**); 3060, 3035, 2940 (**CH**); 1720, 1690, 1650, 1610 (C=O); 1515 (δ**NH**); 1255 (C-O).

Anal. (C₄₀H₄₂ClN₅O₈) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 63.53, 5.60, 9.26; z anal. 63.43, 5.55, 9.15.

Boc-Phe-Arg(*Z*)₂-CH₂Cl (10e, metoda B)

Wydajność: 43%. T. t. 138-141 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.31 (s, 9H, (CH₃)₃C); 1.55, 1.69 (m każdy, 3H i 1H CH₂CH₂CH); 2.84 (m, 2H, PhCH₂); 3.72 (m, 2H, CH₂NH); 3.92 (s, 2H, CH₂Cl); 4.21 (dd, *J*₁ = 14.8 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 1H, **CH**); 4.35 (m, 1H, **CH**); 4.84 (bs, 1H, **NH**); 5.08 (s, 2H, PhCH₂O); 5.16 (układ AB, *J* = 12.2 Hz, 2H, PhCH₂O); 7.00-7.34 (m, 16H, 3 × Ph i **NHCH**); 9.20, 9.36 (bs każdy, 1H i 1H, 2 × **NH**).

IR (KBr, cm⁻¹): ν 3390, 3330, 3285 (**NH**); 3065, 3035, 2980 (**CH**); 1720, 1685, 1660, 1610 (C=O); 1520 (δ**NH**); 1255 (C-O).

Anal. (C₃₇H₄₄ClN₅O₈) C, H, N (%C, %H, %N) obl. 61.53, 6.14, 9.70; z anal. 61.22, 5.82, 9.42.

3-Fenylopropionylo-Arg-CH₂Cl (12a)

HPLC: *t*_R = 24.5 min; gradient (t [min] – %B): 0' – 5%; 10' – 15%; 12' – 25%; 27' – 40%.

¹H NMR (D₂O, ppm): δ 1.23 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.45, 1.73 (m każdy, 1H i 1H, CH₂CH₂CH); 2.63 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 2.92 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 2.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂NH); 4.25 (układ AB, *J* = 16.0 Hz, 2H, CH₂Cl); 4.38 (m, 1H, **CH**); 7.30 (m, 5H, Ph).

3-(4-Hydroksyfenylo)propionylo-Arg-CH₂Cl (12b)

HPLC: *t*_R = 16.7 min; gradient (t [min] – %B): 0' – 10%; 10' – 25%; 20' – 50%.

^1H NMR (D_2O , ppm) δ 1.09 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.31, 1.59 (m każdy, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.45 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, $p\text{-HO-C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.71 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, $p\text{-HO-C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.89 (m, 2H, CH_2NH); 4.05 (układ AB, $J = 17.3$ Hz, 2H, CH_2Cl); 4.20 (dd, $J_1 = 9.8$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, 1H, CH); 6.67, 6.97 (d każdy, $J = 7.8$ Hz, 2H i 2H, C_6H_4).

GABA-Arg- CH_2Cl (12c)

HPLC: $t_{\text{R}} = 12.7$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 1%; 18' – 25%.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.53 i 1.82 (m każdy, 3H i 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ i $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ GABA); 2.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2CONH); 2.89 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2NH_2 GABA); 3.08 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2NH); 4.43 (s, 2H, CH_2Cl); 4.49 (m, 1H, CH).

4-(Aminometylo)fenyloacetylo-Arg- CH_2Cl (12d)

HPLC: $t_{\text{R}} = 12.5$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 10%; 14' – 25%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.59, 1.91 (m każdy, 3H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 3.13 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2NH); 3.65 (s, 2H, CH_2CONH); 4.13 (s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{N}$); 4.44 (s, 2H, CH_2Cl); 4.59 (m, 1H, CH); 7.36 (m, 4H, C_6H_4).

Phe-Arg- CH_2Cl (12e)

HPLC: $t_{\text{R}} = 14.5$ min; gradient (t [min] – %B): 0' – 5%; 20' – 25%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.75-1.95 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.57 (t, $J = 7.6$ Hz, PhCH_2); 3.10 (m, 2H, CH_2NH); 3.99 (s, 2H, CH_2Cl); 4.56 (m, 2H, 2 \times CH); 7.18 (m, 5H, Ph).

5.1.6 Bromometyloketony – pochodne lizyny i argininy

5.1.6.1 Boc-Lys(Cbz)- CH_2Br

Tytułowy związek otrzymano w reakcji pochodnej **1** z HBr. Związek **1** (5 mmol, 2,00 g) rozpuszczono w 50 ml tetrahydrofuranu. Kolbę z roztworem umieszczono na mieszadle magnetycznym w łaźni lód-woda. Po schłodzeniu mieszaniny wkroplono do niej 1,05 g (5,25 mmol) 40 % wodnego roztworu HBr. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC. Stwierdziwszy całkowitą konwersję substratu rozpuszczalniki usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość zmieszano z 60 ml octanu etylu i przemywano w rozdzielaczu 10% roztworem kwasu cytrynowego, 5% roztworem wodorowęglanu sodu i solanką. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po oddzieleniu od środka suszącego i zagęszczeniu uzyskaną mieszaninę oczyszczano chromatograficznie (heksan/octan etylu od 3:1 do 1:1). Otrzymano 2,15 g końcowego produktu w postaci drobnych kryształów.

Wydajność: 94 %. T. t. < 70 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.36 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.47 i 1.53 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.67 i 1.80 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 3.22 (m, 2H, CH_2NH); 3.99 (układ AB, $J = 13.4$ Hz, 2H, CH_2Br); 4.43 (m, 1H, CH); 4.78 (bs, 1H, CH_2NH); 5.02 (AB, $J = 12.6$ Hz, 2H, PhCH_2O); 5.16 (d, $J = 5.4$ Hz, CHNH); 7.27 (m, 5H, C_6H_5).

5.1.6.2 Boc-Arg(Cbz) $_2$ -CH $_2$ Br

Bromometyloketon α -amino-Arg-(Z) $_2$ -CH $_2$ Br otrzymano z diazometinowej pochodnej **4** w reakcji z wodnym roztworem HBr. Użyto 20,0 mmol HBr (4,04 g 40% roztworu wodnego). Reakcję prowadzono w 100 ml THF w 0 °C przez 80 minut kontrolując jej przebieg przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymaną mieszaninę rozrobiono z wodą i octanem etylu, rozdzielono w rozdzielaczu, przemyto solanką, a następnie warstwę organiczną suszono nad siarczanem sodu. Po oddzieleniu środka suszącego rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozrobiono z 30 ml eteru dietylowego i dodatkowo potraktowano heksanem. Mieszaninę odstawiono na kilka godzin do zamrażalnika. Następnie kolbę z mieszaniną ogrzano do temperatury pokojowej, dolano heksanu. Następnie odsączono 11,15 g wytrąconego drobnokrystalicznego, białego osadu.

Wydajność: 90%. T. t. < 60 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.34 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.58 ($2 \times$ m, 2H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ i $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.74 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 3.86 (m, 2H, CH_2NH); 3.88 (układ AB, $J = 15.6$ Hz, 2H, CH_2Br); 4.49 (m, 1H, CH); 5.05 (układ AB, $J = 12.6$ Hz, 2H, PhCH_2O); 5.21 (s, 2H, PhCH_2O); 5.60 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CHNH); 7.28 i 7.33 ($2 \times$ m, 10H, $2 \times \text{C}_6\text{H}_5$); 9.19 i 9.35 ($2 \times$ bs, 1H i 1H, NH guanidynowe).

5.1.6.3 Fenylopropionylo-Lys(Cbz)-CH $_2$ Br (**45**)

Tytułowy bromometyloketon otrzymano według przepisu 5.1.3.1. Użyto 2,0 mmol (0,91 g) Boc-Lys(Cbz)-CH $_2$ Br, 2,4 mmol (0,40 g) chlorku kwasu 3-fenylopropionowego oraz 5 mmol (0,55 ml) NMM. Chromatografię wykonano na silikażelu, stosując roztwory: octan etylu w heksanie kolejno 35%, 40%, 50%, heksan w octanie etylu 35% i 25%. Główną frakcję po zagęszczeniu rekrytalizowano z układu

octan etylu/heksan otrzymując 0,48g produktu w postaci białego, drobnokrystalicznego osadu.

Wydajność: 49%. T. t. 94-96 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.17 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.37 i 1.42 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.51 i 1.73 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.47 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 2.88 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 3.06 i 3.13 ($2 \times$ m, 2H, CH_2NH); 4.08 (układ AB, $J = 16.2$ Hz, 2H, CH_2Br); 4.62 (m, 1H, CH); 4.77 (bs, 1H, CH_2NH); 5.0 (AB, $J = 12.6$ Hz, 2H, PhCH_2O); 6.16 (d, $J = 6.0$ Hz, CHNH); 7.12, 7.21 i 7.28 ($3 \times$ m, 10H, $2 \times \text{C}_6\text{H}_5$).

5.1.6.4 Fenylopropionylo-Arg(Cbz) $_2$ -CH $_2$ Br (60)

Pochodną **60** otrzymano poprzez acylowanie bromometyloketonu Boc-Arg(Cbz) $_2$ -CH $_2$ Br chlorkiem kwasu fenylopropionowego, stosując procedurę opisaną w rozdziale 5.1.3.1 (metoda A). Bromometyloketon argininy (10,0 milimoli 5,20 g) potraktowano nadmiarem HCl w metanolu usuwając z jego grupy α -aminowej resztę ochronną Boc. Surowy produkt odparowano kilkakrotnie z bezwodnym THF, a następnie po zawieszeniu w THF potraktowano nadmiarem (25 mmol, 2,79 ml) NMM. Po 5 minutach do mieszaniny w 0°C wkroplono 12,0 mmol (1,78 ml) chlorku kwasu fenylopropionowego. Po reakcji z mieszaniny usunięto rozpuszczalnik a pozostałość rozpuszczono w mieszaninie woda/octan etylu. Po standardowym przemyciu na kwaśno i zasadowo warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 4,10 g mieszaniny zawierającej dwie pochodne krystaliczne, które rozdzielono chromatograficznie przy pomocy kolumny ze złożem silikażelowym. (od 5:1 do 1:1 heksan/octan etylu). Zidentyfikowano tylko produkt główny, który krystalizowano z układu octan etylu/heksan otrzymując 3,3 g związku w postaci białych, drobnych kryształów.

Wydajność: 51%. T. t. 112-114 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.67 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.24 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 2.76 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 3.49 i 3.66 ($2 \times$ m, 1H i 1H, CH_2NH); 3.98 (układ AB, $J = 15.6$ Hz, 2H, CH_2Br); 4.49 (m, 1H, CH); 5.05 (układ AB, $J = 12.6$ Hz, 2H, PhCH_2O); 5.17 (s, 2H, PhCH_2O); 7.18 (bd, $J = 8.4$ Hz, 1H, CHNH); 7.01, 7.13 i 7.29 ($3 \times$ m, 15H, $3 \times \text{C}_6\text{H}_5$); 9.27 i 9.43 ($2 \times$ bs, 1H i 1H, NH guanidynowe).

5.2 Pochodne otrzymywane z *N*-acylowanych bromometyloketonów lizyny i argininy

5.2.1 Acyloksymetyloketony

5.2.1.1 Fenylopropionylo-Lys(*Z*)-CH₂OC(O)-2,6-di-(trifluorometylo)benzen (62)

Związek **62** otrzymano w reakcji odpowiedniego bromometyloketonu z kwasem 2,6-di(trifluorometylo)benzoesowym w obecności KF. Mieszaninę 1,5 mmol (690 mg) bromometyloketonu **45**, 1,5 mmol kwasu oraz 3,3 mmol (0,19 g) KF w 10 ml DMF ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 60 °C na mieszadło magnetycznym. Przebieg reakcji kontrolowano metodą TLC. Po reakcji z mieszaniny odparowano DMF, pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i przemywano 5% NaHCO₃, 5% kwasem cytrynowym oraz solanką. Warstwę organiczną suszono bezwodnym siarczanem sodu. Po oddzieleniu środka suszającego roztwór zagęszczono. Acyloksymetyloketon oczyszczono chromatograficznie na silikazelu otrzymując po krystalizacji właściwej frakcji 0,31 g końcowego produktu w postaci białych, drobnych kryształów.

Wydajność: 51%. T. t. 124-126 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.27 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.46 i 1.47 (2 × m, 1H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.65 i 1.87 (2 × m, 1H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.56 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 2.98 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 3.16 (m, 2H, CH₂NH); 4.69 (m, 1H, CH); 4.90 (bs, 1H, CH₂NH); 5.0 (układ AB, *J* = 16.8 Hz, 2H, C(O)CH₂O); 5.10 (układ AB, *J* = 12.6 Hz, 2H, PhCH₂O); 6.33 (d, *J* = 6.6 Hz, CHNH); 7.21, 7.29 i 7.35 (3 × m, 10H, 2 × C₆H₅); 7.76 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{para} w C₆H₃); 7.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, 2 × H_{meta} C₆H₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): δ 21.74 (CH₂CH₂CH); 29.51 (CH₂CH₂CH₂CH); 30.22 (CH₂CH₂CH₂CH); 31.42 (PhCH₂CH₂); 37.88 (PhCH₂CH₂); 40.06 (CH₂NH); 55.55 (CH); 66.66 (PhCH₂O); 67.96 (C(O)CH₂O); 121.80 i 123.61 (CF₃); 127.96 (C2 i C6 w pierścieniu reszty Cbz); 128.12, 128.35, 128.54 i 128.57 (CH aromatyczne); 129.23 (C1 w pierścieniu reszty P1'); 129.98 i 130.01 (C3 i C5 w pierścieniu reszty P1'); 136.55 (C1 pierścienia reszty Cbz); 140.53 (C1 w PhCH₂CH₂); 156.77 (OC(O) w Cbz); 164.20 (OC(O) w reszcie P1'); 172.39 (PhCH₂CH₂C(O)); 201.13 (CHC(O)).

5.2.1.2 Fenylopropionylo-Arg-(Z)₂-CH₂OC(O)-2,6-di(trifluorometylo)benzen (63)

Reakcję otrzymywania acyloksymetylowej pochodnej Arg **63** przeprowadzono analogicznie jak dla pochodnej lizynowej **62**. Użyto w tym celu 1,4 mmol (0,88 g) bromometyloketonu **60**, 2,9 mmol (0,19 g) KF, 1,6 mmol (0,42 g) oraz 1,5 g DMF jako rozpuszczalnika. Produkt oczyszczono chromatograficznie stosując kolejno roztwory octanu etylu w heksanie od 30 do 50% objętościowych. Po krystalizacji z układu octan etylu/heksan otrzymano 0,68 g czystego związku.

Wydajność: 60%. T. t. 76-78 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.42 i 1.49 (2 × m, 1H i 1H, CH₂CH₂CH); 1.72, 1.79 (2 × m, 1H i 1H, CH₂CH₂CH); 2.26 i 2.32 (2 × m, 2H, PhCH₂CH₂); 2.84 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 3.61 i 3.77 (2 × m, 2H, CH₂NH); 4.60 (m, 1H, CH); 5.01 (AB, J = 16.8 Hz, 2H, C(O)CH₂O); 5.15 (AB, J = 12.0 Hz, 2H, PhCH₂O); 5.27 (s, 2H, PhCH₂O); 7.09, 7.21 i 7.39 (3 × m, 16H, C₆H₅ i CHNH); 7.76 (t, J = 8.4 Hz, 1H, H_{para} C₆H₃); 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 2 × H_{ortho} C₆H₃); 9.35 i 9.54 (2 × bs, 1H i 1H, NH guanidynowe).

¹³C NMR (CDCl₃, ppm): δ 24.31 (CH₂CH₂CH); 24.77 (CH₂CH₂CH); 31.29 (PhCH₂CH₂); 37.43 (PhCH₂CH₂); 43.95 CH₂NH); 56.42 (CH); 67.39 (PhCH₂O); 68.17 (C(O)CH₂O); 69.07 (PhCH₂O); 121.82 i 123.63 (CF₃); 126.11 (CH pierścienia benzenowego w PhCH₂CH₂); 128.36, 128.39, 128.44, 128.50, 128.62, 128.88, 129.00, 129.05, 129.26 129.48, 129.56, 129.70 i 129.93 (CH pierścieni benzenowych) 129.97 (C3 i C5 w pierścieniu benzenowym reszty P1') i 130.58 (C4 w pierścieniu benzenowym reszty P1') 134.56 i 136.19 (C1 w pierścieniu PhCH₂O); 140.73 (C1 w pierścieniu PhCH₂CH₂); 155.63 (OC(O) w Cbz); 160.86 (C w grupie guanidynowej); 163.42 (OC(O) w Cbz); 164.26 (OC(O) w reszcie P1'); 172.75 (PhCH₂CH₂C(O)); 200.70 (CHC(O)).

5.2.1.3 Fenylopropionylo-Lys-CH₂OC(O)-2,6-di(trifluorometylo)benzen (64)

Odblokowanie grupy aminowej łańcucha bocznego reszty lizyny w związku **62** przebiegało analogicznie, jak dla pozostałych pochodnych lizynowych (TFA/anizol, rozdział 5.1.4).

HPLC: t_R = 20,6 min; gradient (t [min] – %B): 0' – 10%; 5' – 20%; 7' – 40%; 22' – 60%.

¹H NMR (D₂O, ppm): δ 1.07 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.47 (m, 3H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.68 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.56 (t, J = 7.8 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 2.77 (t, J = 7.8 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 2.85 (m, 2H, CH₂NH); 4.31 (m, 1H, CH); 4.87 (układ AB, J = 17.3 Hz, 2H, C(O)CH₂O); 7.16, i 7.25 (2 × m, 5H, Ph); 7.79 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H_{para} C₆H₃); 8.01 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 2 × H_{meta} C₆H₃).

5.2.2 Oksirany

5.2.2.1 3-Fenylopropionylo-Lys(Z)-oksiran (59)

Oksirany otrzymywano w reakcji odpowiedniego bromometyloketonu z borowodorkiem sodu. Bromometyloketon **45** (1,5 mmol 0,70 g) rozpuszczono w 30 ml bezwodnego etanolu w kolbie 100 ml. Roztwór umieszczono na mieszadle magnetycznym i wprowadzono do niego porcjami 2,6 mmol NaBH₄. Po 4 godzinach etanol odparowano, pozostałość rozpuszczono 30 ml octanu etylu i przemywano kolejno 20 ml wody i solanki. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu, odsączono i zagęszczono. Otrzymaną mieszaninę oczyszczano chromatograficznie (silikażel, octan etylu/heksan 1:3, 1:1, 3:2, 3:1). Otrzymano 240 mg białych kryształów.

Wydajność: 31%. T. t. 106-108 °C

¹H NMR (CDCl₃, ppm) δ 1,26 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1,51 i 1,54 (2 × m, 1H i 3H, CH₂CH₂CH₂CH); 2,54 (t, *J* = 7.2, 2H, PhCH₂CH₂); 2.99 (t, *J* = 7.2, 2H, PhCH₂CH₂); 3.14 i 3.18 (2 × m, 1H i 1H, CH₂NH); 3.41 (m, 2H, 2 × H_β pierścienia oksiranowego); 3.69 (m, 1H, H_α, pierścienia oksiranowego); 3.95 (m, 1H, CH); 4.89 (bs, 1H, CH₂NH); 5.11 (układ AB, *J* = 12.0, 2H, PhCH₂); 5.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, CONH); 7.23 i 7.35 (2 × m, 5H i 5H, 2 × Ph).

¹³C NMR (CDCl₃, ppm) δ 22.63 (CH₂CH₂CH₂CH); 28.75 i 29.65 (CH₂CH₂CH₂CH); 31.67 (PhCH₂CH₂); 38.27 (PhCH₂CH₂); 40.19 (CH₂NH); 46.72 (CH_β pierścienia oksiranowego); 52.77 (CH); 66.69 (PhCH₂); 74.44 (CH_α, pierścienia oksiranowego); 126.42, 127.99, 128.17, 128.46, 128.57, 128.62, (CH w Ph); 136.50 (C1 w pierścieniu PhCH₂); 140.51 (C1 w pierścieniu PhCH₂CH₂); 156.83 (PhCH₂OCO); 173.19 (CONH).

5.2.2.2 Fenylopropionylo-Arg(Z)₂-oksiran (61)

Do syntezy argininowego analogu epoksydu **59** zastosowano zmodyfikowaną w niewielkim stopniu procedurę opisaną dla pochodnej **59**. Użyto 2,3 mmol bromometyloketonu **60**, który rozpuszczono na gorąco w 40 ml etanolu, schłodzono następnie do temperatury pokojowej i do mieszanego na mieszadle magnetycznym roztworu dodawano porcjami 3,2 mmol (0,12 g) borowodorku sodu. Reakcję prowadzono 3 godziny kontrolując jej przebieg metodą TLC. Po przeróbce analogicznej jak dla pochodnej **56**, produkt izolowano przy pomocy chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym. Z głównej frakcji eluowanej roztworami heksan/octan etylu od

1:2 do 1:3 odzyskano 0,24 g związku, który okazał się produktem otwarcia oczekiwanego epoksydu. Produkt otrzymano jako skrzepnięty olej.

Wydajność: 18%.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm) δ 1.46 i 1.48 ($2 \times \text{m}$, 2H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.51 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.81 (bs, 1H, OH); 2.27 i 2.32 ($2 \times \text{m}$, 2H, PhCH_2CH_2); 2.83 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 3.38 (d, $J = 6.0$, 1H, CH_2OH); 3.56 i 3.87 ($2 \times \text{m}$, 1H i 1H, $\text{CH}_{2\gamma}$); 3.64 (bs, 1H, OH); 3.86 (bs, 1H, CHOH); 3.87 (m, 2H, CH); 5.12 (układ AB, $J = 12.0$, 2H, PhCH_2); 5.27 (bs, 2H, PhCH_2); 7.11, 7.24, 7.37 ($3 \times \text{m}$, 15H, $3 \times \text{Ph}$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm) δ 23.76 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 24.99 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 31.42 (PhCH_2CH_2); 37.84 (PhCH_2CH_2); 44.20 ($\text{CH}_{2\gamma}$); 46.96 (CH_2OH); 53.44 (CH); 67.33 (PhCH_2); 69.06 (PhCH_2); 74.21 (CHOH); 126.10, 128.41, 128.48, 128.65, 128.88 ($3 \times \text{Ph}$); 134.57 (C1 w pierścieniu PhCH_2); 136.13 (C1 w pierścieniu PhCH_2); 140.84 (C1 w pierścieniu PhCH_2CH_2); 155.76 (PhCH_2OCO); 163.33 (PhCH_2OCO); 173.43 (CONH).

5.3 Synteza α,β -nienasyconych pochodnych lizyny i argininy

5.3.1 Synteza prekursorów aldehydowych

5.3.1.1 Otrzymywanie *N*-acylowanych estrów lizyny i argininy

Estry lizyny i argininy otrzymywano z handlowego Boc-Arg-(Cbz)₂-OH (**2**) oraz z H₂-Lys(Cbz)-OH przygotowywanej z handlowej (*L*)-lizyny. Selektywne blokowanie grupy ϵ -aminowej lizyny przeprowadzano przy pomocy chloromrówczanu benzylu w obecności NaOH kompleksując uprzednio grupę α -aminową i karboksylową aminokwasu jonami Cu^{2+} .

Do kolby okrągłodennej (500 ml) odważono 18,5 g (0,11 mola) wodzianu lizyny, który rozpuszczono w 185 ml wody. Następnie do kolby wprowadzono 31,0 g (0,14 mola) zasadowego węglanu miedzi ($\text{CuCO}_3 \times \text{Cu(OH)}_2$) i zawartość ogrzewano do wrzenia przez 1 godzinę. Mieszaninę reakcyjną odsączono na gorąco i stałą pozostałość przemyto gorącą wodą. Do przesączu dodano 40 ml 6M NaOH, 30 ml dioksanu, a następnie, po schłodzeniu w łaźni lód/woda do mieszaniny wkroplono 21,3 g (0,125 mola) chloromrówczanu benzylu. Wypadający kompleks odsączono, przemyto wodą i niewielką ilością acetonu, a następnie zawieszono w 248 ml 2 M HCl. Ogrzewając mieszaninę do 60 °C wkraplano do niej 0,5 M roztwór wodny siarczku sodu, aż do momentu, kiedy nie strąca się już siarczek miedzi. Powstały siarczek odsącza się przez

celit, a przesącz zubożoną stężoną wodą amoniakalną obserwując wydzielanie osadu Lys(Cbz)OH (16,3 g, 51%).

Blokowane aminokwasy estryfikowano metodą z SOCl₂. Substraty rozpuszczano w metanolu (10 mmol w 70 ml) i traktowano 2,5-krotnym nadmiarem chlorku tionylu w 0 °C. Reakcje prowadzono przez 6 do 10 godzin w temperaturze pokojowej, po czym z mieszaniny reakcyjnej usuwano rozpuszczalnik, a pozostałość odparowywano dwukrotnie z suchym benzenem. Uzyskane chlorowodorki estrów (**16**, **17**) wytrącano eterem dietylowym i odsączano, po czym używano w kolejnym etapie bez oczyszczania (wydajność powyżej 95%).

5.3.1.1.1 3-Fenylopropionylo-Lys(Cbz)-OMe (**18a**)

Acylowany ester *N*-Cbz-blokowanej lizyny **18a** otrzymano w reakcji chlorowodorku **16** z handlowym chlorkiem kwasu 3-fenylopropionowego. Do kolby kulistej odważono 30 mmol (9,39 g) chlorowodorku estru lizyny i zawieszono go w 70 ml bezwodnego THF. Kolbę ustawiono na mieszadle magnetycznym i mieszaninę schłodzono do temperatury 0 °C w łaźni lód/woda. Następnie do mieszaniny dodano 75 mmol (8,34 ml) NMM i po 5 minutach rozpoczęto wkraplanie 33 mmol (4,90 ml) chlorku kwasowego. Mieszanie kontynuowano przez 10 godzin pozwalając na powolne ogrzewanie się mieszaniny reakcyjnej. Po tym czasie z mieszaniny odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość potraktowano wodą i octanem etylu, aż do całkowitego rozpuszczenia składników mieszaniny. Fazy rozdzielono i organiczną przemywano dwukrotnie kolejno 5% KHSO₄, 5% NaHCO₃, a na koniec solanką. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego mieszaninę zagęszczono, na gorąco traktowano heksanem do zmętnienia i pozostawiono do krystalizacji. Otrzymano 11,9 g produktu (97%) w postaci białych, drobnych kryształów.

Wydajność: 97%. T. t. 91-93 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.16 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.39 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.55 i 1.62 (m i m, 1H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.45 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 2.89 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 3.07 (m, 2H, CH₂NH); 3.64 (s, 3H, OCH₃); 4.51 (m, 1H, CH); 4.72 (bs, 1H, NH); 5.01 (s, 2H, PhCH₂O); 5.94 (bd, *J* = 6.6 Hz, 1H, CONH); 7.10 i 7.18 (2 × m, 5H, Ph); 7.25 (m, 5H, Ph).

5.3.1.1.2 4-(Aminometylo)fenyloacetylo-Lys(Cbz)-OMe (**18d**)

Ester **18d** otrzymywano acylując ester Lys(Cbz)-OMe chlorkiem kwasu 4-(*N*-benzyloksykarbonyloaminometylo)fenylooctowego.

Chlorek przygotowano w oddzielnym eksperymencie w reakcji kwasu 4-[*N*-(benzyloksykarbonyloamino)metylo]fenylooctowego z chlorkiem tionylu według standardowej procedury.

Użyto 3,3 milimola (1g) kwasu oraz pięciokrotny nadmiar (16,7 mmol, 1,22 ml) SOCl₂. Surowy chlorek po kilkukrotnym odparowaniu z bezwodnym benzenem rozpuszczono w 10 ml bezwodnego THF i wkroplono do chłodzonej w łaźni lód/woda mieszaniny 16.7 mmol (1,07 g) chlorowodoru estru metylowego lizyny i trzykrotnego nadmiaru NMM (50 mmol, 6,97 ml) w 60 ml bezwodnego THF. Reakcję kontynuowano przez 10 godzin, po czym z mieszaniny odparowano THF. Pozostałość rozpuszczono w 30 ml mieszaniny octanu etylu i 5% KHSO₄. Fazy rozdzielono i organiczną przemywano jeszcze 25 ml porcjami 5% NaHCO₃ oraz solanki, a następnie suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po oddzieleniu środka suszącego, warstwę organiczną zagęszczono i krystalizowano z octanu etylu wytrącając 1,6 g drobnokrystalicznego osadu mieszaniną heksanu i eteru dietylowego.

Wydajność: 83%. T. t. 108-110 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.24 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.43 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.61 i 1.78 (2 × m, 1H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.98 (m, 2H, CH₂NH); 3.56 (AB, *J* = 15.6, 2H, CH₂CO); 3.71 (s, 3H, OCH₃); 4.36 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NHCH₂C₆H₄); 4.56 (m, 1H, CH); 4.79 (bs, 1H, NHCH₂); 5.07 (s, 2H, PhCH₂O przy N_ε); 5.16 (s, 2H, PhCH₂O przy NCH₂C₆H₄); 5.99 (bd, *J* = 6.6 Hz, 1H CONH); 7.24, 7.26 (2 × m 5H, Ph); 7.34 (m, 10H, 2 × Ph).

5.3.1.1.3 *N*-Benzoilo-Lys(Cbz)-OMe (**18f**)

Związek **18f** otrzymano poprzez acylowanie chlorowodoru estru metylowego *N*-Cbz-lizyny (**16**). Odważono 2,00 g **16**, i zawieszono w bezwodnym THF. W temperaturze 0 °C do roztworu wkroplono 21,0 mmol (3,00 ml) NMM, a po 3 minutach rozpoczęto wkraplanie 7,5 mmol (0,87 ml) chlorku benzoilu. Po sprawdzeniu zasadowości mieszaniny reakcyjnej (pH około 9) mieszanie kontynuowano przez noc. Mieszaninę przerabiano standardowo. Odparowano THF, pozostałość rozpuszczono w mieszaninie octanu etylu z 5% wodnym KHSO₄. Warstwę organiczną przemywano dodatkowo 5% roztworem kwaśnego węgla sodu, ponownie kwasem i zasadą i na koniec solanką, porcjami po 30 ml. Fazę organiczną suszono nad siarczanem sodu.

Produkt izolowano przy pomocy chromatografii kolumnowej stosując jako eluent roztwory octanu etylu w heksanie kolejno 30%, 35% 40% i 50% v/v. Właściwą frakcję rekrytalizowano w octanie etylu wytrącając go heksanem. Otrzymano 1,50 g pochodnej **18f**.

Wydajność: 62%. T. t. 74-76 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.38 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.47 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.64 i 1.73 (m i m, 1H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 3.16 (m, 2H, CH₂NH); 3.47 (s, 3H, OCH₃); 3.90 (m, 1H, CH) 4.77 (bs, 1H, CH₂NH); 5.12 (s, 2H, PhCH₂O); 5.25 (bd, *J* = 9.0 Hz, 1H CONH); 7.31 7.35 (2 × m 1H i 4H, Ph). 7.49, 7.55 i 7.82 (3 × m 2H, 1H i 2H, Ph).

5.3.1.1.4 3-Fenylopropionylo-Arg(Cbz)₂-OMe (19a)

Tytułowy ester otrzymywano zgodnie z przepisem podanym dla analogu lizynowego **18a**. Użyto odpowiednio 10,0 mmol (4,92 g) chlorowodoru Arg(Cbz)₂-OMe, 25,0 mmol (2,78 ml) NMM oraz 12 mmol (1,78 ml) chlorku kwasu fenylopropionowego. Otrzymano 4,82 g produktu w postaci białych, drobnych kryształów.

Wydajność: 82%. T. t. 122,5-124,5 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.48 (m, 3H, CH₂CH₂CH); 1.65 (m, 1H, CH₂CH₂CH); 2.30 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 2.75 i 2.79 (2 × m, 1H i 1H, PhCH₂CH₂); 3.57 (s, 3H, OCH₃); 3.64 i 3.82 (2 × m, 1H i 1H, CH₂NH); 4.56 (m, 1H, CH); 5.04 (układ AB, *J* = 12.6 Hz, 2H, PhCH₂O); 5.16 (układ AB, *J* = 12.0 Hz, 2H, PhCH₂O); 6.60 (bd, *J* = 7.8 Hz, 1H, CHNH); 7.02, 7.13 7.24 i 7.31 (4 × m, 15H, 3 × C₆H₅); 9.20 i 9.38 (2 × bs, 1H i 1H, NH guanidynowe).

5.3.1.1.5 N-Cbz-GABA-Arg(Cbz)₂-OMe (19c)

Pochodną **19c** otrzymano metodą mieszanych bezwodników (**metoda B**, rozdział 5.1.3.2) W celu przygotowania mieszanego bezwodnika do kolby umieszczonej w łaźni chłodzącej (-10 °C), zawierającej roztwór 3 mmol kwasu N-Cbz-GABA (0,78 g) i 4,2 mmol NMM (0,466 ml) w bezwodnym THF, wkroplono 3,9 mmol (0,56 ml) chloromrówczan izobutyli. Reakcję kontynuowano godzinę stosując mieszanie magnetyczne. Roztwór bezwodnika po odsączeniu chlorowodoru NMM wkroplono do przygotowanego w odrębnym etapie roztworu Arg(Cbz)₂-OMe w bezwodnym THF. Drugi z substratów przygotowano przez potraktowanie 3 mmol (1,43 g) chlorowodoru

Arg(Cbz)₂-OMe 3,7 mmol (0,42 ml) NMM w bezwodnym THF. Produkt krystalizowano z układu octan etylu/heksan otrzymując 1,74 g drobnokrystalicznego osadu.

Wydajność: 89%. T. t. 118-121 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.68 (2 × m, 6H, CH₂CH₂CH i CH₂CH₂CH₂); 2.01 (m, 2H, CH₂CO); 3.04 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂); 3.58 (s, 3H, OCH₃); 3.78 i 3.98 (2 × m, 1H i 1H, CH₂NH); 4.56 (m, 1H, CH); 4.94 (m, 1H, NHCH₂CH₂CH₂); 4.99 (s, 2H, (PhCH₂O, grupa NH w GABA), 5.06 (s, 2H, PhCH₂O); 5.16 (s, 2H, PhCH₂O); 6.60 (bd, J = 7.8 Hz, 1H, CHNH); 7.28 (m, 15H, 3 × C₆H₅); 9.23 i 9.40 (2 × bs, 1H i 1H, NH guanidynowe).

5.3.1.1.6 4-(Aminometylo)fenyloacetylo-Arg(Cbz)₂-OMe (19d)

Tytułowy ester otrzymano zgodnie z procedurą opisaną dla analogu lizynowego **18d** (rozdz. 5.3.1.1.2). Do przygotowania chlorku kwasowego użyto 3 mmol (897mg) kwasu 2-(4-*N*-benzyloksykarbonyloaminofenylo)octowego oraz 12 mmol (0,88 ml) SOCl₂. Otrzymanym chlorkiem acylowano 3 mmol (1,48 g) chlorowodoru estru metylowego blokowanej argininy po uprzednim potraktowaniu chlorowodoru aminokwasu dwu i półkrotnym nadmiarem (7,5 mmol, 1,05 ml) Et₃N. Produkt krystalizowano w układzie octan etylu/heksan. Otrzymano 1,5g docelowego związku w postaci drobnych kryształów.

Wydajność: 70%. T. t. 147-148,5 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.49 (m 2H, CH₂CH₂CH); 1.60 i 1.69 (2 × m, 2H, CH₂CH₂CH); 2.01 (m, 2H, CH₂CO); 3.32 (układ AB, J = 15.6 Hz, C₆H₄CH₂CO); 3.71 (s, 3H, OCH₃); 3.73 i 3.88 (2 × m, 1H i 1H, CH₂NH); 4.26 (bs, 1H, NHCH₂C₆H₄); 4.52 (m, 1H, CH); 5.02 (m, 1H, NHCH₂C₆H₄); 5.03 (s, 2H, (PhCH₂O, grupa NHCH₂C₆H₄); 5.06 (s, 2H, PhCH₂O); 5.17 (s, 2H, PhCH₂O); 6.53 (bd, J = 7.8 Hz, 1H, CHNH); 7.04 i 7.10 (2 × d, J = 7.8 Hz, 2H i 2H, C₆H₄CH₂CO); 7.28 (m, 15H, 3 × C₆H₅); 9.18 i 9.37 (2 × bs, 1H i 1H, NH guanidynowe).

5.3.1.2 3-Fenylopropionylo-Lys(Cbz)-H (22a, sposób I)

Ester **18a** 10,0 mmol (3,90 g,) rozpuszczono w 70 ml bezwodnego tetrahydrofuranu i w atmosferze azotu schłodzono przy pomocy kriostatu do -65 °C. Do roztworu mieszanego na mieszadle magnetycznym wkroplono 17,0 ml 25% DIBAL-H w toluenie w ciągu 30 minut. Mieszanie kontynuowano przez kolejne 40 minut, po czym do mieszaniny reakcyjnej wkroplono 1,50 ml MeOH, a po kolejnych 10 min. usunięto

łaźnię alkoholową. Z ocieplonej mieszaniny reakcyjnej usunięto rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 70 ml octanu etylu i w łaźni lód/woda potraktowano 250 ml 10% roztworu kwasu cytrynowego. Mieszaninę tą po 1 godzinie przesączono przez celit oddzielając wydzielony wodorotlenek glinu. Przesącz rozdzielono w rozdzielaczu. Warstwę organiczną przemyto solanką i suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik odparowano, a pozostałą mieszaninę zawierającą aldehyd **22a** używano w następnym etapie bez dodatkowego oczyszczania.

5.3.1.3 Otrzymywanie aldehydów z odpowiednich alkoholi

5.3.1.3.1 Otrzymywanie alkoholi z *N*-acylowanych estrów

5.3.1.3.1.1 6-*N*-benzyloksykarbonyloamino-2-(3-fenylopropionyloamino)heksanol (20a)

Alkohol **20a** otrzymano z estru **18a** poprzez redukcję borowodorkiem sodu. Ester **18a** (10 mmol, 4,26 g) rozpuszczono w 60 ml świeżo destylowanego THF. Roztwór przeniesiono do ustawionej na mieszadle magnetycznym kolby zawierającej 0,1 mola (4,20 g) bezwodnego LiCl oraz 0,1 mola (3,78 g) borowodoru sodu. Zawiesinę mieszano w temperaturze pokojowej przez 30 minut, po czym do kolby dolano 60 ml etanolu i kontynuowano mieszanie przez 10 godzin, stwierdzając całkowitą konwersję substratu na podstawie analizy mieszaniny reakcyjnej metodą TLC. Następnie mieszaninę potraktowano 5% roztworem KHSO₄ dodając go porcjami, aż do momentu, kiedy ustanie gwałtowne pienienie będące efektem rozkładu nadmiaru borowodoru litu. Po usunięciu z mieszaniny rozpuszczalników organicznych, fazę wodną ekstrahowano trzema porcjami (30 ml) CH₂Cl₂. Połączone warstwy organiczne przemyto dwukrotnie solanką i suszono nad bezwodnym Na₂SO₄. Podczas odparowywania rozpuszczalnika z roztworu wytrącił się biały, drobnokrystaliczny osad, który rozrobiono z heksanem i odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując 3,80 g alkoholu **20a**.

Wydajność: 95%. T. t. 88-91 °C.

¹H NMR(CDCl₃, ppm): δ 1.20 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.33, 1.38 (2 × m, 1H i 3H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.43 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 2.91 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 3.09 (m, 2H, CH₂NH); 3.42 (m, 2H, CH₂OH); 3.77 (m, 1H, CH);

4.85 (m, 1H, CH₂NH) 4.99 (układ AB, *J* = 12 Hz, 2H, PhCH₂O); 5.78 (bd, *J* = 7.2 Hz, 1H, CHNH); 7.04, 7.11 i 7.24 (3 × m, 10H, 2 × Ph).

5.3.1.3.1.2 6-*N*-benzyloksykarbonyloamino-2- {[4-(*N*-benzyloksykarbonylo)aminometylo]-(*N*-fenyloacetylo)amino}heksanol (20d)

Alkohol **20d** otrzymywano według przepisu jak wyżej. Użyto po 27,8 mmol, odpowiednio 1,16 g i 1,05 g borowodorku sodu i bezwodnego LiCl. Reakcję przeprowadzono w 60 ml mieszaniny 1:1 THF/H₂O. Produkt wydzielono jako bezbarwny, gęsty olej i używano w następnym etapie bez dodatkowego oczyszczania.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.17 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.36 i 1.49 (2 × m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 3.01 (m, 2H, CH₂NH); 3.48 (2 × m, 4H, CH₂CO oraz CH₂OH); 3.78 (m, 1H, CH); 4.48 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NHCH₂C₆H₄); 4.79 (m, 1H, CH₂NH) 5.00 (s, 2H, PhCH₂O przy NH_ε); 5.05 (s, 2H, PhCH₂O przy NCH₂C₆H₄) 5.23 (bs, 1H, NHCH₂C₆H₄); 5.70 (bd, *J* = 6.6 Hz, 1H, CONH); 7.19, 7.24 i 7.26 (3 × m, 14H, Ph).

5.3.1.3.1.3 5-(2,3-dibenzyloksykarbonyloguanidyno)-2-[3-(fenylopropionylo)amino]pentanol (21a)

Alkohol **21a** otrzymano z estru **19a** redukując go borowodorkiem sodu w obecności LiCl, podobnie, jak w przypadku pochodnych lizyny. Użyto 4,0 mmol (2,35 g) estru **19d** i po 20,0 mmol NaBH₄ i LiCl, odpowiednio 0,74 g i 0,84 g. Otrzymano 2,0 g, 88% alkoholu **21a** w postaci bezbarwnego, gęstego oleju.

5.3.1.3.2 Utlenianie alkoholi do aldehydów

5.3.1.3.2.1 6-*N*-benzyloksykarbonyloamino-2-[3-(fenylopropionylo)amino]heksanal (22a)

Tytułowy związek otrzymano przez utlenienie alkoholu **20a** metodą Swerna. 13,0 mmol chlorku oksalilu rozpuszczono w bezwodnym dichlorometanie (30 ml) i przelano do kolby okrągłodennej zaopatrzonej we wkraplacz zamknięty septą, w którym umieszczono roztwór 30 milimoli (2,13 ml) bezwodnego DMSO w 15 ml bezwodnego CH₂Cl₂. Uszczelnioną smarem aparaturę ustawiono na mieszadle magnetycznym w łaźni alkoholowej, której temperaturę kontrolowano przy pomocy kriostatu. Po osiągnięciu w łaźni temperatury poniżej -60 °C rozpoczęto wkraplanie roztworu DMSO. Po upływie 20 minut od zakończenia wkraplania do wkraplacza przeniesiono

przy pomocy strzykawki roztwór 10,0 milimoli alkoholu **20a** w 15 ml bezwodnego dichlorometanu i całość wkropiono do mieszaniny reakcyjnej. Po upływie kolejnych 90 minut do kolby wprowadzono 50,0 mmol (7,00 ml) Et₃N i kontynuowano mieszanie jeszcze przez pół godziny. Po usunięciu z łaźni chłodzącej mieszaninę ogrzano do temperatury pokojowej, a następnie potraktowano 60 ml nasyconego roztworu chlorku amonowego. Całość przelano do rozdzielacza i oddzielono warstwę organiczną. Warstwę wodną ekstrahowano trzykrotnie dichlorometanem. Połączone warstwy organiczne przemywano 5% roztworem KHSO₄, 5% roztworem wodorowęglanu sodu i solanką, a następnie suszono bezwodnym siarczanem sodu. Surowy produkt po usunięciu dichlorometanu używano w kolejnym etapie bez dalszego oczyszczania. Na podstawie widma ¹H NMR mieszaniny poreakcyjnej stwierdzono 95% konwersji substratu.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.18 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.42 i 1.81 (2 × m, 3H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.50 (t, J = 7.7 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 2.89 (t, J = 7.7 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 3.08 (m, 2H, CH₂NH); 4.35 (m, 1H, CH); 4.79 (m, 1H, CH₂NH) 5.05 (s, 2H, PhCH₂O); 6.09 (b, 1H, CHNH); 7.08-7.25 (m, 10H, 2 × Ph) 9.39 (s, 1H, CHO).

5.3.1.3.2.2 6-N-benzylloksykarbonyloamino-2-{{4-(N-benzylloksykarbonyloaminometylo)fenyloacetylo}amino}heksanal (**22d**)

Aldehyd **22d** otrzymano utleniając wyjściowy alkohol **18d** metodą Swerna zgodnie z procedurą opisaną dla anlogu **22a**. Użyto 1,0 mmol (0,55 g) alkoholu, 1,2 mmol (100 μl) chlorku oksalilu, 3 mmol (213 μl) bezwodnego DMSO oraz 5 mmol (700 μl) Et₃N. Po standardowej przeróbce aldehyd używano w następnym etapie bez dalszego oczyszczania. Konwersję substratu monitorowano przy pomocy TLC. Ilość aldehydu w mieszaninie poreakcyjnej oceniono w przybliżeniu na podstawie integracji dwóch sygnałów w widmie ¹H-NMR: δ 3.12 (multiplet, nałożone sygnały alkoholu i aldehydu, integracja 6, CH₂NH_ε) oraz 9.51 (singlet, integracja 1, CHO). Z proporcji intensywności sygnałów wynikało, że aldehyd stanowił około 33% molowych mieszaniny.

5.3.1.3.2.3 5-(2,3-dibenzyloksykarbonyloguanidyno)-2-[(3-fenylpropionylo)amino]pentanal (23a)

Aldehyd **23a** otrzymano podobnie, jak w przypadku analogicznych pochodnych lizynowych poprzez utlenienie odpowiedniego alkoholu metodą Swerna. Do reakcji wzięto 3,78 mmol (0,32 ml) chlorku oksalilu, 9,45 mmol (0,67 ml) bezwodnego DMSO oraz 3,0 mmol (1,76 g) alkoholu **21a**. Reakcję przeprowadzono w 3 ml bezwodnego chlorku metylenu.

Zawartość aldehydu w mieszaninie poreakcyjnej szacowano w przybliżeniu na podstawie widma protonowego jądrowego rezonansu magnetycznego:

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , ppm): δ 9.25 i 9.38 (bs i s nał. na bs, integracja odp. 1.88 i 2.85 NH guanidynowy i nałożony NH guanidynowy z CHO).

Na podstawie powyższych danych zawartość aldehydu w mieszaninie poreakcyjnej zawierającej wyjściowy alkohol oceniono na około 52%.

5.3.1.4 Otrzymywanie aldehydu poprzez redukcję amidu Weinreb'a

5.3.1.4.1 *N,O*-Dimetylohydroksyamid kwasu 6-*N*-benzyloksykarbonyloamino-2-(benzoiloamino)heksanowego

Tytułowy amid (amid Weinreb'a) syntezowano z kwasu otrzymanego przez hydrolizę zasadową estru **18f**. Do kolby ustawionej na mieszadle magnetycznym odważono 4,8 mmol (1,90 g) estru **18f** i rozpuszczono w 40 ml metanolu, po czym do roztworu dodawano porcjami 12 ml 2M NaOH. Mieszanie kontynuowano przez 36 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie z mieszaniny odparowano metanol, a pozostałość rozcieńczono 20 ml wody i traktowano 2 M HCl w 0 °C, aż do całkowitego strącenia otrzymanego kwasu (pH = 1). Uzyskany kwas wyekstrahowano do octanu etylu. Warstwę organiczną przemyto solanką i suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po oddzieleniu środka suszącego, warstwę organiczną zagęszczono, potraktowano na gorąco heksanem i pozostawiono do krystalizacji. W efekcie uzyskano 2,15 g kwasu **24f**.

Do kolby okrągłodennej (100 ml) odważono 2,15 g (5,6 milimola) kwasu **24f** rozpuszczono w 30 ml bezwodnego THF i ustawiono na mieszadle magnetycznym. Następnie do kolby dodano 0,86 ml Et_3N (6,15 mmol), 2,48 g (5,6 mmol) BOP oraz 0,60 g (6,15 mmol) *N,O*-dimetylohydroksyloaminy i po chwili kolejną porcję 0,86 ml Et_3N . Reakcję kontynuowano przez 5 godzin, po czym z mieszaniny usunięto

rozpuszczalnik, a pozostałość rozpuszczono w mieszaninie octan etylu/woda. Warstwę organiczną przemyto na kwaśno i zasadowo oraz solanką, a następnie suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po oddzieleniu odsączeniu środka suszącego przesącz zagęszczono i naniesiono na kolumnę wypełnioną silikażelem. Właściwą frakcję eluowano 45 % roztworem octanu etylu w heksanie. W wyniku krystalizacji z układu octan etylu/heksan otrzymano 1,20 g (50 %) końcowego związku **26f** w postaci drobnokrystalicznego osadu.

Wydajność: 50%. T. t. 119-121 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.49 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.56 i 1.62 (2 × m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.75 i 1.88 (2 × m, 1H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 3.21 (m, 2H, CH₂NH); 3.23 (s, 3H, NCH₃); 3.85 (s, 3H, OCH₃); 4.99 (bs, 1H, CH₂NH); 5.09 (układ AB, J = 12.6 Hz, PhCH₂O); 5.23 (m, 1H, CH); 7.03 (d, J = 7.8 Hz, 1H, CHNH); 7.36 (m, 5H, Ph); 7.42 (t, J = 7.2 Hz, 2H, protony *meta* reszty benzoilowej); 7.50 (t, J = 6.6 Hz, 1H, protony *para* reszty benzoilowej); 7.84 (d, J = 7.3 Hz, 2H, protony *orto* reszty benzoilowej).

5.3.1.4.2 6-N-benzylloksykarbonylamino-2-(benzoilamino)heksanal

Tytułowy aldehyd otrzymano redukując pochodną **26f** glinowodorkiem litu. W kolbie dwuszyjnej zaopatrzonej w kapilarę doprowadzającą azot ustawionej w łaźni alkoholowej chłodzonej kriostatem na mieszadle magnetycznym, rozpuszczono 2,1 mmol (0,9 g) amidu **26f** w 25 ml bezwodnego THF. Po schłodzeniu łaźni do -10 °C do mieszaniny reakcyjnej dodano 2,1 ml 1.0 M roztworu LAH w THF, przy pomocy strzykawki przez septę w ciągu 7 minut. Mieszanie w temperaturze -10 °C kontynuowano 25 minut, po czym ogrzano łaźnię do 0 °C i reakcję prowadzono kolejne 20 minut. Po tym czasie do mieszaniny dodano roztwór 0,57 g KHSO₄ w 2,3 ml wody destylowanej. Następnie z mieszaniny reakcyjnej usunięto THF pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość ekstrahowano trzykrotnie 15 ml porcjami chloroformu. Warstwy organiczne połączono i przemyto kolejno 20 ml porcjami roztworów: 1 × 1 M HCl, 2 × 5% NaHCO₃ i 2 × solanka, a następnie suszono bezwodnym siarczanem sodu. Po wysuszeniu i oddzieleniu środka suszącego mieszaninę odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 35 °C. W trakcie zagęszczania z mieszaniny wytrącił się biały osad aldehydu **22f** (0,77 g), który użyto w następnym etapie bez dodatkowego oczyszczania.

Wydajność: 98%. T. t. 91-93 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.26 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.48 i 1.52 (2 × m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.71 i 1.98 (2 × m, 1H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 3.13 (m, 2H, CH₂NH); 4.63 (m, 1H, CH); 4.84 (bs, 1H, CH₂NH); 4.93 (układ AB, J = 12.1 Hz, PhCH₂O); 6.91 (d, J = 4.8 Hz, 1H, CHNH); 7.27 (m, 5H, Ph); 7.35 (t, J = 7.8 Hz, 2H, protony *meta* reszty benzoilowej); 7.44 (t, J = 6.6 Hz, 1H, protony *para* reszty benzoilowej); 7.84 (d, J = 7.2 Hz, 2H, protony *orto* reszty benzoilowej); 9.58 (s, 1H, CHO).

5.3.2 Otrzymywanie α,β-nienasyconych amidów z odpowiednich kwasów uzyskanego przez hydrolizę estrów zsyntezowanego w oparciu o reakcję Wittiga

5.3.2.1 Ester metylowy kwasu (*E*)-8-*N*-benzyloksykarbonyloamino-4-[*N*-((3-fenylopropionylo)amino)okt-2-enowego (29)

W kolbie zaopatrzonej w kapilarę doprowadzającą N₂ w 70 ml bezwodnego THF zawieszono 20,0 mmol chlorku trifenylmetylenofosfonianu metylu, a następnie umieszczono ją w łaźni o temperaturze -65 °C na mieszadle magnetycznym. Po 20 minutach do zawiesiny soli fosfoniowej wkroplono 20,0 mmol (8,00 ml 2,5 M roztworu) *n*-BuLi w ciągu 5 min. Kolbę z otrzymaną mieszaniną usunięto z łaźni i pozwolono na ogrzanie się jej zawartości do temperatury pokojowej. Po ponownym schłodzeniu do -65 °C do mieszaniny reakcyjnej wkroplono roztwór aldehydu **22a** w 20 ml bezwodnego THF. Po 30 minutach rozpoczęto powolne ogrzewanie łaźni do temperatury pokojowej. Po 3 godzinach do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 60 μl wody. Następnie z mieszaniny usunięto THF, a pozostałość rozpuszczono w mieszaninie octan etylu/woda. Fazy rozdzielono. Wodną ekstrahowano ponownie octanem etylu i połączone warstwy organiczne (60 ml) przemyto solanką, a następnie suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odfiltrowaniu środka suszącego i usunięciu rozpuszczalnika na wyparce rotacyjnej, pozostałość oczyszczono chromatograficznie na silikazelu stosując do elucji układy octan etylu/heksan kolejno 1:1, 2:1 i 3:1. Główna frakcję o masie 1,55 g rekrytalizowano z octanu etylu stosując do wytrącania heksan. Krystaliczny winyloester otrzymano z wydajnością 34%.

Wydajność: 34%. T. t. 82-84 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.26 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.47 i 1.55 (2 × m, 3H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.53 (t, J = 7.2 Hz, 2H, PhCH₂CH₂); 2.97 (t, J = 7.2 Hz, PhCH₂CH₂); 3.16 (m, 2H, CH₂NH); 3.74 (s, 3H, OCH₃); 4.58 (m, 1H, CHNH); 4.95 (bs, 1H, CH₂NH); 5.10 (układ AB, J_{AB} = 8.4 Hz, CH₂O); 5.79 (d, J = 14.4 Hz,

¹H, CHCHCO); 6.47 (dd, $J_1 = 15.61$, $J_2 = 4.8$, 1H, CHCHCO); 7.20, 7.27 i 7.35 (3 × m, 3H i 2H, 5H, 2 × Ph).

¹³C NMR (CDCl₃, ppm) δ 22.40 (CH₂CH₂CH); 29.58 (CH₂CH₂CH₂CH); 31.65 (PhCH₂CH₂); 33.42 (CH₂CH₂CH₂CH); 38.31 (PhCH₂CH₂); 40.08 (CH₂NH); 49.73 (CH); 52.65 (OCH₃); 66.66 (CH₂O); 120.69 (CHCHCO); 126.34, 128.00, 128.14, 128.38, 128.55, 128.59 (C1 w Ph); 136.54 (C1 w C₆H₅CH₂O); 140.69 (C1 w pierścieniu C₆H₅CH₂CH₂); 147.95 (CHCHCO); 156.72 (CH₂OC(O)); 166.69 (COOMe); 171.81 (CONH).

5.3.2.2 Kwas (*E*)-8-*N*-benzyloksykarbonyloamino-4-[*N*-(3-fenylopropionilo)amino]okt-2-enowy (30)

Hydrolizę zasadową estru **29** przeprowadzono w metanolu. Do umieszczonej na mieszadle magnetycznym kolby z rozpuszczonym estrem (2,0 mmol, 1,00 g) wdroplono 2,00 ml 2 M wodnego roztworu NaOH. Mieszanie kontynuowano przez 10 godzin. Po tym czasie usunięto z mieszaniny metanol, a pozostałość przeniesiono do zlewki zawierającej pokruszony lód i traktowano 2M wodnym roztworem HCl do osiągnięcia kwaśnego odczynu (pH = 1) mieszaniny. Wypadający olej ekstrahowano z warstwy wodnej trzema porcjami octanu etylu. Połączone warstwy organiczne (75 ml) przemyto dodatkowo solanką i suszono nad siarczanem sodu. Uzyskaną mieszaninę oddzielono od środka suszącego i po zagęszczeniu oczyszczono chromatograficznie na silikażelu. Jako eluent zastosowano kolejno roztwory 35, 25, 15, 10 i 5 % heksanu w octanie etylu. Nienasycony kwas (0,78 g) o czystości 90% otrzymano z wydajnością 81%.

Wydajność: 81%. T. t. 84-86 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.23 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.47 i 1.54 (2 × m, 1H i 3H; CH₂CH₂CH₂CH); 2.55 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 2.98 (t, $J = 6.9$ Hz, PhCH₂CH₂); 3.16 (m, 2H, CH₂NH); 4.61 (m, 1H, CHNH); 4.99 (bs, 1H, CH₂NH_ε); 5.08 (m, 2H, CH₂O); 5.79 (d, $J = 15.61$ Hz, 1H, CHCHCO); 6.02 (NHCH) 6.84 (dd, $J_1 = 15.61$, $J_2 = 4.8$, 1H, CHCHCO); 7.19, 7.29, 7.33 (3 × m, 3H i 2H, 5H, 2 × Ph).

5.3.2.3 Ester metylowy kwasu 7-(2,3-dibenzyloksykarbonyloguanidyno)-4-[*N*-(3-fenylopropionilo)amino]hept-2-enowego (31) oraz produkt jego odblokowania (66)

Tytułowy ester **31** otrzymano zgodnie z dwuetapową procedurą opisaną dla jego lizynowego analogu **29** (przepisy 5.3.1.2.3 oraz 5.3.2.1). Skalę eksperymentu w obu etapach zmniejszono pięciokrotnie w relacji do przepisów podanych dla analogu lizynowego. Skład mieszaniny otrzymanej na etapie redukcji estru **19a** do aldehydu **23a** za pomocą DIBAL-H nie był określany i po przeróbce jak w 5.3.1.2.3 użyto ją bez dodatkowego oczyszczania w kolejnym etapie. Końcowy produkt **31** po chromatografii

otrzymano w mieszaninie z wyjściowym estrem **19a** w ilości 110 mg. Chromatografię przeprowadzono na złożu silikażelowym stosując kolejno 50, 55, 60 i 70% (objętościowo) roztwór heksanu w octanie etylu. Mieszaninę estrów **19a** i **31** rozdzielono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej na odwróconej fazie (złoże C18) po odblokowaniu grup aminowych obu związków. Warunki usuwania grup ochronnych opisano w rozdziale 5.1.5.2.

HPLC: $t_R = 19,85'$ min; gradient ($t[\text{min}] - \%B$): $0' - 10\%$; $26' - 35\%$.

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , ppm): δ 1.21 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.30, 1.51 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2.57 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 2.89 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 2.97 (m, 2H, CH_2NH); 3.68 (s, 3H, OCH_3); 4.28 (m, 1H, CH); 5.61 (dd, $J_1 = 16.2$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, $\text{CHCHC}(\text{O})$); 6.66 (dd, $J_1 = 15.6$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H, $\text{CHCHC}(\text{O})$); 7.19 (m, 3H, H_{ortho} i H_{para} w Ph); 7.27 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{meta} w Ph).

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O , ppm): δ 24.19 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 29.74 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 31.29 (PhCH_2CH_2); 37.24 (PhCH_2CH_2); 40.43 (CH_2NH); 49.64 (CH); 52.17 (OCH_3); 119.77 ($\text{CHCHC}(\text{O})$); 126.50 (C4 w Ph); 128.57, 128.64 (C2, C6, oraz C3, C5 w Ph); 140.06 (C1 w Ph); 148.15 ($\text{CHCHC}(\text{O})$); 154.37 ($\text{NHC}(\text{=NH})$); 168.99 ($\text{C}(\text{O})\text{OMe}$); 175.41 ($\text{C}(\text{O})\text{NH}$).

5.3.2.4 Przygotowanie 4-*N*-benzylloksykarbonylofenylenodiaminy (**36**), prekursora reszty P1' amidowych akceptorów typu Michael'a

5.3.2.4.1 Sposób I

Blokowanie grupy aminowej fenylenodiaminy przeprowadzono z użyciem chloromrówczanu benzylu w obecności NMM. W kolbie okrągłodennej przygotowano roztwór 37,0 mmol (4,00 g) aminy w 70 ml chlorku metylenu. Kolbę umieszczono na mieszadle magnetycznym w łaźni lód/woda. Po 5 minutach do kolby dodano 40 mmol (4,44 ml) NMM, a następnie rozpoczęto wkraplanie 37,0 mmol (5,30 ml) chloromrówczanu benzylu. Po 10 godzinach z mieszaniny reakcyjnej usunięto rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w układzie octan etylu/woda i fazy rozdzielono. Warstwę octanu etylu przemyto solanką i suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Analiza TLC wykazała, że mieszanina poreakcyjna zawiera wiele produktów. Rozdzielono ją chromatograficznie stosując złoże silikażelowe i kolejno układy octan etylu/heksan o zwiększającej się zawartości octanu etylu od 40 do 75 %. Uzyskano 0,64 g końcowego związku z niską wydajnością, około 7 %.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 3.49 (bs, 1H, NH_2); 5.12 (s, 2H PhCH_2O); 6.43 (bs, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}$); 6.58 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, C_6H_4 , protony przy NHCO); 7.08 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, C_6H_4 , protony przy NH_2); 7.30 (m, 5H, C_6H_5).

5.3.2.4.2 Sposób II

5.3.2.4.2.1 Synteza *N*-benzyloksykarbonylo-4-nitroaniliny (35)

Tytułową pochodną otrzymano z 4-nitroaniliny w reakcji z chloromrówczanem benzyłu w obecności NaOH. W łaźni lód/woda umieszczono kolbę 500 ml zawierającą 160 ml 1 M roztworu NaOH, 60 ml dioksanu, oraz 0,14 mola (20 g) 4-nitrofenyloaminy. Do mieszanej na mieszadle magnetycznym mieszaniny reakcyjnej wkroplono 0,16 mola (22,72 ml) chloromrówczanu benzyłu. Reakcję kontynuowano przez 10 godzin. Po tym czasie z mieszaniny reakcyjnej usunięto dioksan pod zmniejszonym ciśnieniem. Wytrącający się osad odsączono i przemyto wodą. Po wysuszeniu uzyskaną mieszaninę krystalicznych produktów rozdzielono chromatograficznie stosując octan etylu/heksan jako układ eluentów w proporcjach od 1:3 do 1:1. Frakcję eluowaną w układzie 1:1 rekrystalizowano z octanu etylu uzyskując 20 g związku **34** (45%).

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 5.16 (układ AB, $J = 19.9$ Hz, 2H, PhCH_2O); 7.06 (bs, 1H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}$); 7.32 (m, 5H, C_6H_5); 7.49 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, C_6H_4 , protony przy NHCO); 8.11 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, C_6H_4 , protony przy NO_2).

5.3.2.4.2.2 Redukcja *N*-benzyloksykarbonylo-4-nitroaniliny do 4-*N*-benzyloksykarbonylofenylenodiaminy (36)

Pochodną **36** otrzymywano przez redukcję związku **35** sześciokrotnym nadmiarem dwuwodnego chlorku cyny we wrzącym octanie etylu. Po 3 godzinach, na podstawie analizy TLC, stwierdzano całkowitą konwersję substratu. Mieszaninę reakcyjną traktowano nasyconym wodnym roztworem wodorowęglanu sodu aż do uzyskania odczynu zasadowego. Wytrącający się nieorganiczny osad odsączano, a przesącz przemywano solanką i suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Roztwór otrzymanej aminy zagęszczano i pozostawiano do krystalizacji.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 3.49 (bs, 2H, NH_2); 5.12 (s, 2H, PhCH_2O); 6.43 (bs, 1H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}$); 7.49 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, C_6H_4 , protony przy NH_2); 7.15, 7.31 ($2 \times$ m, 2H i 5H, C_6H_4 , protony przy NHCO oraz C_6H_5).

5.3.2.5 *N*-[4-*N'*-(benzyloksykarbonylo)fenylo]amid kwasu 8-(*N*-benzyloksykarbonylo)-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego (27a) (sposób 1)

Docelowy α,β -nienasycony amid syntezowano z nienasyconego kwasu **30** przeprowadzając go w pierwszym etapie zgodnie ze standardową procedurą w chlorek kwasowy przy pomocy chlorku tionylu i acylując nim aminę **36**. W ustawionej na mieszadle magnetycznym kolbie 50 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono roztwór 0,9 mmol (400 mg) kwasu **30** w 20 ml bezwodnego chlorku metylenu. Następnie do roztworu wprowadzono 4,9 mmol (0,36 ml) chlorku tionylu. Mieszanie w temperaturze pokojowej kontynuowano przez 1 godzinę, po czym mieszaninę ogrzewano utrzymując ją w stanie łagodnego wrzenia przez kolejne dwie godziny. Po tym czasie z mieszaniny reakcyjnej usunięto dichlorometan a pozostałość rozpuszczono w bezwodnym toluenie i ponownie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy chlorek rozpuszczono w 3 ml bezwodnego CH_2Cl_2 i wkroplono do umieszczonej na mieszadle magnetycznym w łaźni lód/woda kolby zawierającej roztwór 1 mmol (0,14 g) aminy **35** oraz 1,5 mmol (0,15 ml) NMM w 4 ml absolutnego CH_2Cl_2 . Mieszanie kontynuowano 1 godzinę stwierdzając postęp reakcji na podstawie analizy metodą TLC. Po kolejnych dwóch godzinach z mieszaniny odmyto wodą powstały chlorowodorek NMM, a warstwę organiczną przemyto solanką i suszono bezwodnym siarczanem sodu. Widmo ^1H NMR z mieszaniny reakcyjnej nie ujawniło obecności ugrupowania winylowego, z tego względu zrezygnowano z jej chromatograficznego oczyszczenia.

5.3.2.6 *N*-[4-*N'*-(benzyloksykarbonyloamino)fenylo]amid kwasu 8-(*N*-benzyloksykarbonylo)-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]-okt-2-enowego (27a) (sposób 2)

Sprzęganie aminowego prekursora (4-*N*-benzyloksykarbonylofenylenodiaminy) reszty P1' z nienasyconym kwasem **30** przeprowadzono przy pomocy HBTU. Do ustawionej na mieszadle magnetycznym kolby kulistej odważono 0,5 mmol (220 mg) nienasyconego kwasu **30** i rozpuszczono go w 10 ml bezwodnego THF. Następnie do kolby dodano 2,5 mmol (0,35 ml) trietyloaminy oraz 0,75 milimola (285 mg) HBTU. Po 5 minutach od rozpoczęcia mieszania do kolby przez septę wprowadzono roztwór

0,5 mmol (121 mg) reagenta aminowego w 1 ml bezwodnego THF. Mieszanie kontynuowano 10 godzin. Po tym czasie z mieszaniny reakcyjnej odparowano THF, a pozostałość rozrobiono z 5% roztworem NaHCO₃ i octanem etylu. Nerozpuszczony osad odsączono i przemyto 5% roztworami KHSO₄ i NaHCO₃, wodą i na koniec kilkakrotnie octanem etylu. Przesącz zawierał śladowe ilości głównego składnika wydzielonego osadu. Wysuszony, drobnokrystaliczny osad (50 mg) okazał się właściwym produktem.

Wydajność: 15%. T. t. 176-178 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): δ 1.22 (m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.38 (m, 3H, CH₂CH₂CH₂CH); 1.53 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.45 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 2.86 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 2.99 (m, 2H, CH₂NH); 4.41 (m, 1H, CH); 5.01 (s, 2H, PhCH₂ przy NH_ε); 5.15 (s, 2H, PhCH₂ przy C₆H₄NH); 6.12 (d, J = 15.0 Hz, 1H, CHCHCO); 6.66 (dd, J₁ = 15.1, J₂ = 5.4, 1H, CHCHCO); 7.18-7.44 (m, 18H, 3 × Ph, NH_ε, 2H z C₆H₄); 7.57 (d, J = 8.4 Hz, 2H, C₆H₄); 7.99 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NHCH); 9.71 i 10.01 (2 × s, 2 × 1H, HNC₆H₄NH).

¹³C NMR (DMSO-d₆, ppm): δ 23.20 (CH₂CH₂CH); 29.62 (CH₂CH₂CH₂CH); 31.65 (PhCH₂CH₂); 33.84 (CH₂CH₂CH₂CH); 37.55 (PhCH₂CH₂); 40.60 (CH₂NH); 49.72 (CH); 65.59 (PhCH₂ przy NH_ε); 66.13 (PhCH₂ przy C₆H₄NH); 119.06, 120.22 (CH z C₆H₄); 124.17 (CHCHCO); 126.36, 128.20, 128.49, 128.81 (CH aromatyczne); 134.58, 135.05 (C1 i C4 z C₆H₄); 137.17 (C1 z PhCH₂ przy C₆H₄NH); 137.76 (C1 z PhCH₂ przy NH_ε); 141.74 (C1 z PhCH₂CH₂); 144.79 (CHCHCO); 153.88 (C₆H₄NHCO); 156.57 (CONH_ε); 163.46 (CHCHCO); 171.32 (PhCH₂CH₂CO).

5.3.3 Olefinacja w oparciu o reakcję HWE

5.3.3.1 2-[4-(N-benzylloksykarbonyloamino)anilino]-2-oksoetylofosfonian dietylu (33)

Związek docelowy otrzymano poprzez sprzęganie komercyjnego kwasu dietoksyfosfonooctowego i aminy **36**. W kolbie o objętości 100 ml umieszczono 10,0 mmol (2,60 g) aminy **36** i rozpuszczono ją w 40 ml bezwodnego THF. Po wprowadzeniu do kolby 10,0 mmol (1,61 ml) kwasu dietoksyfosfonooctowego, 13,0 mmol (1,80 ml) Et₃N, przy ciągłym mieszaniu jej zawartości przy pomocy mieszadła magnetycznego, dodano jeszcze 11 mmol (4,17 g) HBTU i kolbę zabezpieczono rurką z chlorkiem wapnia. Mieszanie w temperaturze pokojowej kontynuowano 20 godzin. Po tym czasie odparowano THF, a pozostałość zawieszono w octanie etylu. Osad, który nie rozpuścił się w rozpuszczalniku odsączono, a przesącz przemywano na kwaśno i na zasadowo oraz solanką. Po usunięciu z warstwy organicznej śladów wody bezwodnym Na₂SO₄

mieszaninę zagęszczono na wyparce rotacyjnej i oczyszczano chromatograficznie. Stosowano kolejno roztwory 40% i 50% octanu etylu w heksanie, 30 i 10 % heksanu w octanie etylu oraz czysty octan etylu. Właściwa frakcja eluowana jest 5% roztworem metanolu w octanie etylu. Po rekrytalizacji z układu octan etylu/heksan otrzymano 2,46 g docelowego związku w postaci drobnokrystalicznego osadu.

Wydajność: 59%. T. t. 121-122,5 °C.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 1.36 (2 × t, *J* = 7.0 Hz, 6H, 2 × CH₂CH₃); 3.03 (bd, *J* = 20,9 Hz, 2H, CH₂P); 4.17 (m, 4H, 2 × CH₂CH₃); 5.19 (s, 2H, PhCH₂); 6.98 (bs, 2H, CONH); 7.16 (d, *J* = 10Hz, 2H, C₆H₄); 7.27 (m, 7H, PhCH₂ i C₆H₄); 9.05 (bs, 1H, NHCbz).

5.3.3.2 *N*-[4-*N'*-(benzyloksykarbonylo)amino]fenyloamid kwasu 8-(*N*-benzyloksykarbonylo)-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]okt-2-enowego (27a) (sposób 3)

Tytułowy związek otrzymano w reakcji HWE stosując fosfonoamid **33** jako reagent nukleofilowy. W 50 mililitrowej kolbie okrągłodennej rozpuszczono 2,38 milimola (1,00 g) fosfonoamidu **33**, DBU (0,36 g, 355 μl) w bezwodnym acetonitrylu. Do mieszanego na mieszadle magnetycznym klarującego się roztworu dodano następnie 0,60 g LiCl. Mieszanie kontynuowano 30 minut, po czym do mieszaniny wkropiono roztwór aldehydu **22a** w bezwodnym acetonitrylu. Po 60 minutach zaobserwowano wytrącanie się osadu w kolbie reakcyjnej. Mieszanie kontynuowano kolejne 10 godzin, po czym odsączono wydzielony osad. Analiza spektroskopowa osadu ujawniła obecność oczekiwanego produktu. W przesączu metodą TLC stwierdzono tylko ślady docelowego związku i nie poddano tej mieszaniny dokładniejszej analizie. Produkt stały okazał się trudno rozpuszczalny na gorąco w większości rozpuszczalników organicznych dogodnych w technikach krystalizacyjnych. Ponieważ docelowo miał on być odblokowany i oczyszczany metodą HPLC na odwróconej fazie, zrezygnowano z jego rekrytalizacji. Dane spektroskopowe zamieszczono wyżej opisując „sposób 2” syntezy (rozdział 5.3.2.6).

5.3.3.3 *N*-[4-*N'*-(benzyloksykarbonylo)amino]fenyloamid kwasu 8-benzyloksykarbonyloamino-4-{{4-(*N*-benzyloksykarbonyloaminometylo)fenyloacetylo}amino}okt-2-enowego (27d)

Związek **27d** otrzymano z aldehydu **22d** oraz fosfonoamidu **33** zgodnie z procedurą opisaną dla pochodnej **27a**. Użyto 1,0 mmol pochodnej fosfonowej (420,2 mg) 1,2

mmol DBU (180 μ l) i 6,0 mmol (0,25 g) bezwodnego LiCl oraz surową mieszaninę po utlenianiu alkoholu **20d**. Produkt otrzymano z niską, 12% wydajnością, liczoną na alkohol wzięty do reakcji otrzymywania aldehydu.

Wydajność: 12%. T. t. 181-183 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 1.24 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.38, (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.49 i 1.56 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.89 (m, 2H, CH_2NH); 3.64 (układ AB, $J = 13.8$ Hz, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$); 4.17 (s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$); 4.37 (m, 1H, CH); 5.01, 5.04 i 5.15 ($3 \times$ s, 2H, 2H i 2H, PhCH_2O); 6.14 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCHCO); 6.76 (dd, $J_1 = 15.6$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H, CHCHCO); 7.21 i 7.36 ($2 \times$ m, 5H i 10H, $3 \times \text{C}_6\text{H}_5$); 7.22 (m, 1H, NH_ϵ); 7.56 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}$); 7.79 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}$); 8.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NHCH); 9.69 i 10.05 ($2 \times$ bs, $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NH}$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 23.23 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 29.57 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 33.87 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 40.57 (CH_2NH); 42.43 ($\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$); 44.07 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$); 50.01 (CH); 65.59 (PhCH_2O przy NH_ϵ); 65.83 (PhCH_2O przy $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}$); 66.12 (PhCH_2O przy $\text{HNC}_6\text{H}_4\text{NH}$); 119.08 (CH aromatyczne); 120.32 (C3 i C5 z pierścienia w $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}$); 124.46 (CHCHCO); 127.41, 128.21, 128.25, 128.48, 128.53, 128.82, 128.92, 129.40 (CH aromatyczne); 135.44 (C1 w pierścieniu $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}$); 137.18 (C1 w PhCH_2O reszty P1'); 137.66 (C1 w PhCH_2O reszty P2); 137.76 (C1 w PhCH_2CO przy NH_ϵ); 138.21 (C4 w $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}$); 144.50 (CHCHC(O)); 153.90 ($\text{PhCH}_2\text{OC(O)}$ podstawnika P1'); 156.59 ($\text{PhCH}_2\text{OC(O)}$ przy NH_ϵ); 156.84 ($\text{PhCH}_2\text{OC(O)}$ w podstawniku P2); 163.49 (CHCHC(O)); 170.14 (C(O)NH_ϵ).

5.3.3.4 *N*-[4-*N'*-(benzyloksykarbonylo)amino]fenyloamid kwasu 8-(*N*-benzyloksykarbonylo)-4-(*N*-benzoiloamino)okt-2-enowego (**27f**)

Tytułową pochodną otrzymano zgodnie z przepisem 3.3.3.2. Użyto odpowiednio 2,9 mmol (1,20 g) fosfonoamidu **33**, 3,15 mmol (0,48 ml) DBU, 12,4 mmol (0,52 g) bezwodnego LiCl oraz 2,1 mmol (0,77 g) aldehydu **22f**. Wytrącający się w trakcie reakcji końcowy produkt **27f** odsączono, przemyto octanem etylu i wysuszono. Otrzymano 1,27 g właściwego produktu w postaci białego, drobnokrystalicznego osadu.

Wydajność: 91 %. T. t. 182-184 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 1.52 i 1.55 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.65 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.89 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 3.20 (m, 2H, CH_2NH); 4.85 (m, 1H, CH); 5.20 (s, 2H, PhCH_2O); 5.33 (s, 2H, PhCH_2O); 6.53 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H, CHCHC(O)); 6.99 (dd, $J_1 = 15.01$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H, CHCHC(O)); 7.49-7.55 (m, 5H, Ph); 7.56-7.62 (m, 8H, Ph , CH_2NH , $2 \times \text{H}_{orto}$ z C_6H_4); 7.67 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, protony *meta* reszty benzoilowej); 7.73 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, 1H, proton *para* reszty benzoilowej); 7.98 (bd, $J = 8.0$ Hz, 1H, NHCH); 7.80 (d, $J = 9.0$ Hz, $2 \times \text{H}_{meta}$ z C_6H_4); 8.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, protony *orto* reszty benzoilowej).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 23.56 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 29.57 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 33.67 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 40.09 (CH_2NH); 50.67 (CH); 65.52 (PhCH_2O , przy NH_ϵ); 65.97 (PhCH_2O , przy $\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}$); 119.21 i 120.27 (CH w C_6H_4); 124.54 ($\text{CHCHC}(\text{O})$); 127.99 (C2 i C6 w reszcie benzoilowej); 128.12 (C2 i C6 w PhCH_2O przy NH_ϵ); 128.17 (C4 w PhCH_2O przy NH_ϵ); 128.40 (C3 i C5 w PhCH_2O w P1'); 128.65 (CH aromatyczne w reszcie benzoilowej); 128.80 (CH aromatyczne w PhCH_2O przy NH_ϵ); 128.88 (C2 i C6 w PhCH_2O w P1'); 131.64 (C4 w reszcie benzoilowej); 134.71 (C1 w C_6H_4); 137.37 (C4 w C_6H_4); 137.75 (C1 w PhCH_2O przy NH_ϵ); 144.36 ($\text{CHCHC}(\text{O})$); 154.15 ($\text{C}(\text{O})$ w P1'); 156.58 ($\text{C}(\text{O})$ przy NH_ϵ); 163.60 ($\text{CHCHC}(\text{O})$); 166.38 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{O})$).

5.3.3.5 *N*-[4-*N'*-(benzyloksykarbonylo)fenylo]amid kwasu 7-(2,3-dibenzyloksykarbonyloguanidyno)-4-[*N*-(3-fenylopropionylo)amino]hept-2-enowego (37a)

Związek **37a** otrzymano przeprowadzając reakcję HWE między aldehydem **23a** oraz fosfonoamidem **32**, zgodnie z procedurą opisaną dla pochodnej **27a**. Użyto 3,8 mmol (1,59 g) pochodnej fosfonowej, 9,4 mmol, (0,67 ml), DBU, 22,7 mmol (0,95 g) bezwodnego LiCl oraz surową mieszaninę po utlenianiu alkoholu **21a**. Reakcję prowadzono w 20 ml bezwodnego acetonitrylu przez 10 godzin. Produkt otrzymano w postaci krystalicznej z niską wydajnością (31%, 0,8g).

Wydajność: 31%. T. t. 168-171 °C.

^1H NMR, (DMSO- d_6 , ppm) δ 1.39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.31 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 2.72 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 3.68 i 3.78 (2 \times m, 1H i 1H, NHCH_2); 4.31 (m, 1H, CH); 4.94, 5.05 i 5.15 (3 \times s, 2H, 2H i 2H, 3 \times PhCH_2O); 6.01 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H, CHCHCO); 6.52 (dd, $J_1 = 15.3$ Hz, $J_2 = 5.8$ Hz, 1H, CHCHCO); 7.06 (m, 5H, **Ph**), 7.16-7.31 (m, 17H, 3 \times **Ph** oraz sygnał z C_6H_4); 7.47 (d, $J_1 = 8.8$ Hz, 2H, C_6H_4); 9.05 (bs, 2H, **NH** guanidynowe); 9.57 i 9.92 (2 \times s, 1H i 1H, $\text{HNC}_6\text{H}_4\text{NH}$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 25.59 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 31.65 (PhCH_2CH_2); 31.84 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 37.56 (PhCH_2CH_2); 44.85 (CH_2NH); 49.68 (m, 1H, CH); 66.11 (PhCH_2O); 66.57 (PhCH_2O przy HNC_6H_4); 68.71 (PhCH_2O); 120.31 (C2 i C6 wzgl. NHCBz w P1'); 124.42 (CHCHCO); 126.29, 128.18, 128.29, 128.48, 128.51, 128.67, 128.68, 128.80, 128.91, 129.09 (CHar); 134.70, 135.02 (C1 i C4 w C_6H_4), 135.76, 137.18 (C1 w PhCH_2CO przy N reszty guanidynowej) 137.58 (C1 w PhCH_2CO w podstawniku P1'); 141.71 (C1 w PhCH_2CH_2); 144.35 (CHCHCO); 153.91, 155.45 (CO reszt Cbz blokujących resztę Arg) 163.40, 163.50 (CHCHCO i CONHC_6H_4); 171.34 (CONHCH).

5.3.4 Odblokowanie końcowych grup aminowych otrzymanych pochodnych α,β -nienasyconych – dane analityczne

Grupy aminowe wszystkich pochodnych α,β -nienasyconych odblokowywano w standardowy sposób przedstawiony wyżej dla *N*-acylowanych chlorometyloketonów

lizyny i argininy (rozdziały 5.1.4 oraz 5.1.5.2). Otrzymane mieszaniny rozdzielano za pomocą HPLC na odwróconej fazie. Właściwe produkty zidentyfikowane metodami spektroskopowymi liofilizowano i przechowywano w -20 °C. W przypadku związku **27f** zamiast właściwej pochodnej wyodrębniono tylko produkt jej wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji **39**. Podobnie w wyniku odblokowania związku **37a** obok oczekiwanej pochodnej **38a** w mieszaninie po reakcji znaczący udział stanowił produkt **40**, powstający w wyniku analogicznej przemiany, jak związek **39**.

5.3.4.1 Ester metylowy kwasu (*E*)-8-amino-4-[(3-fenylpropionylo)amino]okt-2-enowego (**65**, odblokowana forma **29**)

HPLC: $t_R = 16.85$ min; gradient (t[*min*] – %B): 0' – 5%; 5' – 15%; 7' – 25%; 22' – 45%.
 $^1\text{H NMR}$ (D_2O , ppm): δ 1.09 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.31 i 1.49 ($2 \times$ m, 1H i 3H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.56 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 2.77 (m, 2H, CH_2NH) 2.87 (t, $J = 6.9$ Hz, PhCH_2CH_2); 3.69 (s, 3H, OCH_3); 4.29 (m, 1H, CHNH); 5.71 (dd, $J = 15.61$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, CHCHCO); 6.47 (dd, $J_1 = 15.61$, $J_2 = 4.8$, 1H, CHCHCO); 7.19 i 7.27 ($2 \times$ m, 5H, **Ph**).

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O , ppm): δ 21.69 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 26.17 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 31.30 (PhCH_2CH_2); 32.08 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 37.25 (PhCH_2CH_2); 39.19 (CH_2NH); 49.78 (CHNH); 52.16 (OCH_3); 119.63 (CHCHCO); 126.53, 128.59, 128.67 (**CH** aromatyczne, **Ph**); 140.15 (**C1** w **Ph**); 148.42 (CHCHCO); 169.04 (C(O)OMe); 175.36 (C(O)NH).

5.3.4.2 *N*-(4-aminofenyl)amid kwasu (*E*)-8-amino-4-[(3-fenylpropionylo)amino]okt-2-enowego (**28a**)

HPLC: $t_R = 17.2'$ min; gradient (t[*min*] – %B): 0' – 5%; 18' – 35%; 23' – 65%.
 $^1\text{H NMR}$ (D_2O , ppm): δ 1.05 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.31, 1.42 ($2 \times$ m, 1H i 3H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.50 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 2.77 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, CH_2NH) 2.81 (t, $J = 6.9$ Hz, PhCH_2CH_2); 4.23 (m, 1H, **CH**); 5.71 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, CHCHCO); 6.47 (dd, $J_1 = 15.4$, $J_2 = 5.7$, 1H, CHCHCO); 7.11 (m, 5H, **Ph**); 7.30 (d, $J = 8.4$, 2H, C_6H_4); 7.51 (d, $J = 8.4$, 2H, C_6H_4).

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O , ppm) δ 21.97 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 26.20 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 31.35 (PhCH_2CH_2); 32.30 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 37.26 (PhCH_2CH_2); 39.21 (CH_2NH); 49.82 (**CH**); 122.81 (**C3** i **C5** w pierścieniu benzenowym w reszcie **P1'**); 122.86 (CHCHCO); 123.23 (**C2** i **C6** w pierścieniu benzenowym w reszcie **P1'**); 126.41 (**C4** w **Ph**); 127.90 (**C1** w pierścieniu benzenowym w reszcie **P1'**); 128.59, 128.69 (**CH** w **Ph**); 136.89 (**C1** w **Ph**); 140.13 (**C4** w pierścieniu benzenowym w reszcie **P1'**); 144.80 (CHCHCO), 166.67 (C(O)NH , przy **P1'**) 175.24 (CONH_α).

5.3.4.3 *N*-(4-aminofenyl)amid kwasu (*E*)-8-amino-4-{[4-(aminometylo)fenyloacetylo]amino}okt-2-enowego (**28d**)

HPLC: $t_{R1} = 9.45'$ min; gradient 1 (t[*min*] – %B): 0' – 10%; 18' – 45%; 22' – 65%;
 $t_{R2} = 14,15'$ min; gradient 2 (t[*min*] – %B): 0' – 0%; 18' – 30%; 22' – 65%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.38 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.59, 1.69 (m i m, 3H i 1H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.89 (m, 2H, CH_2NH); 3.64 (s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$); 4.11 (s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$); 4.48 (m, 1H, CH); 6.12 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCHCO); 6.76 (dd, $J_1 = 15.6$, $J_2 = 5.4$, 1H, CHCHCO); 7.32 (nałożone d z dwóch pierścieni, 4H, C_6H_4); 7.37 (d, $J = 7.8$, 2H, $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$); 7.51 (d, $J = 9.0$, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$).

^{13}C NMR (D_2O , ppm) δ 22.20 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 26.24 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 32.45 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 39.23 (CH_2NH); 41.95 ($\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$); 42.72 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$); 50.40 (CH); 122.93 (C3 i C5 w C_6H_4 w P1'); 123.01 (CHCHCO); 123.37, (C2 i C6 w C_6H_4 w P1'); 129.23 (C3 i C5 w C_6H_4 w P2); 129.59 (C1 w C_6H_4 w P1'); 129.81 (C2 i C6 w C_6H_4 w P2); 131.57 (C1 w C_6H_4 w P2); 136.02 (C4 w C_6H_4 w P2); 137.17 (C4 w C_6H_4 w P1'); 144.95 (CHCHCO), 166.63 (CHCHCO), 174.01 (CH_2CO).

5.3.4.4 Produkt (39) wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji *N*-(4-aminofenylo)amidu kwasu 8-amino-4-(*N*-benzoiloamino)okt-2-enowego (28f)

HPLC: $t_R = 11.1'$ min; gradient (t[min] – %B): 0' – 5%; 22' – 20%; 29' – 75%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.49 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.59 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.67, 1.74 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.88 (m, 4H, $\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NHCH}_2$); 3.85 (m, 1H, CH); 5.68 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NHCH}_2$); 7.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $2 \times \text{H}_{meta}$ w C_6H_4); 7.21 (d, $J = 8.4$ Hz, $2 \times \text{H}_{orto}$ w C_6H_4); 7.34 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{meta} reszty benzoilowej); 7.51 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{para} reszty benzoilowej); 7.86 (d, $J = 7.3$ Hz, $2 \times \text{H}_{orto}$ reszty benzoilowej).

^{13}C NMR (D_2O , ppm): δ 21.53 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 26.45 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 28.91 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 39.00 ($\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NHCH}_2$); 39.02 ($\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NHCH}_2$); 53.79 (CH); 70.16 ($\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NHCH}_2$); 122.82 (C2 i C6 w C_6H_4); 123.67 (C3 i C5 w C_6H_4); 126.60 (C4 w C_6H_4); 127.93 (C1 w reszcie benzoilowej); 128.83 (C3 i C5 w reszcie benzoilowej); 129.70 (C2 i C6 w reszcie benzoilowej); 134.48 (C4 w reszcie benzoilowej); 137.09 (C1 w C_6H_4); 167.10 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{O})$); 170.10 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$).

5.3.4.5 *N*-(4-Aminofenylo)amid kwasu (*E*)-7-guanidyno-4-[(3-fenylopropionylo)amino]hept-2-enowego (38a) oraz produkt jego wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji (40)

Związek 38a

HPLC: $t_{R1} = 16.7'$ min; gradient (t[min] – %B): 0' – 5%; 20' – 40%;

^1H NMR (D_2O , ppm) δ 1.12-1.27 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.41 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.47 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 2.78 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 2.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, NHCH_2); 4.21 (m, 1H, CH); 5.72 (dd, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 1.41$ Hz, 1H, CHCHCO); 6.44 (dd, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 5.8$ Hz, 1H, CHCHCO); 7.02-7.17 (m, 5H, Ph), 7.27 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 2H, C_6H_4); 7.48 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, C_6H_4).

^{13}C NMR, (D_2O , ppm) δ 24.27 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 29.97 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 31.34 (PhCH_2CH_2); 37.26 (PhCH_2CH_2); 40.47 (NHCH_2); 49.71 (CH); 115.38 (C1 w C_6H_4); 122.84 (CHCHCO); 122.84, 122.95 (C2, C3 C5 i C6 w C_6H_4); 126.40 (C4 w C_6H_5 oraz C1 w C_6H_4); 128.67, 128.58 (C2, C3, C5 i C6 w C_6H_5); 140.05 (C4 w C_6H_4); 144.50 (CHCHCO); 156.61 (C w grupie guanidynowej); 166.61 (CHCHCO); 175.30 (CONH).

Związek 40

HPLC: $t_{R1} = 15.8'$ min; gradient (t[min] – %B): 0' – 5%; 20' – 40%;

^1H NMR (D_2O , ppm) δ 1.60, 1.61 ($2 \times \text{m}$, 2H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.75 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}$); 2.77 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 2.83 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 3.08, 3.11 ($2 \times \text{m}$, 1H i 1H, NHCH_2); 3.54 (m, 1H, CH); 5.45 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}$); 7.08 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{para} w C_6H_5); 7.13 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_{orto} w C_6H_5); 7.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_{meta} w C_6H_5); 7.30 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_{meta} w C_6H_4); 7.41 (dd, $J = 9.0$ Hz, H_{orto} w C_6H_4).

^{13}C NMR, (D_2O , ppm) δ 23.84 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 26.52 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 29.73 (PhCH_2CH_2); 34.42 (PhCH_2CH_2); 38.68 ($\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}$); 40.39 (NHCH_2); 53.48 (CH); 68.88 ($\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}$); 122.72 (C3 i C5 w C_6H_4); 123.42 (C2 i C6 w C_6H_4); 126.46 (C4 w C_6H_5); 127.45 (C4 w C_6H_4); 128.09 (C2 i C6 w C_6H_5); 128.62 (C3 i C5 w C_6H_5); 136.86 (C1 w C_6H_4); 140.11 (C1 w C_6H_5); 156.74 ($\text{NHC}(=\text{NH})\text{NHCH}_2$); 169.71 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHC}_6\text{H}_4$); 174.00 ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$).

5.4 Synteza pochodnych γ -okso- α,β -nienasyconych

5.4.1 Addycja prekursora reszty P1' do sililowego eteru enolowego (ścieżka II)

3-Fenylopropinylo-Lys(Cbz)- CH_3

Przekształcenie 1,5 mmol (0,73 g) bromometyloketonu **45** w metyloketon w obecności 1,5 mmol (10 mg) pyłu cynkowego w 25 ml kwasu octowego (t. pok. 10 godzin, intensywne mieszanie) przebiegło z wydajnością 75 %. W celu wyodrębnienia produktu mieszaninę rozcieńczono 50 ml octanu etylu, odsączono jej stałe składniki, a pozostałość przemywano nasyconym roztworem NaHCO_3 i solanką, warstwy organiczne suszono nad bezwodnym siarczanem sodu i po oddzieleniu środka suszącego odparowano rozpuszczalnik. Otrzymano 0,46 g produktu **46** w postaci gęstego oleju, który używano w następnym etapie bez dodatkowego oczyszczania.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.12, 1.18 ($2 \times \text{m}$, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.42, 1.43 ($2 \times \text{m}$, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.45, 1.83 ($2 \times \text{m}$, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.53 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 2.95 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 3.14 (m, 1H, CH_2NH); 4.58 (m, 1H, CH); 4.84 (bs, 1H, CH_2NH); 5.07 (s, 2H, PhCH_2O); 6.22 (bd, $J = 6.6$ Hz, 1H CONH); 7.19, 7.26, 7.33 ($3 \times \text{m}$ 10H, $2 \times \text{Ph}$).

2-(Fenylotio)octan etylu (**43**)

Docelowy związek otrzymano używając 40 mmol (4,11 ml) tiofenolu, 42 mmol (4,66 ml) bromooctanu etylu oraz 60 mmol (5,00) ml pirydyny. Produkt **43** otrzymano ilościowo (8,07 g). i bez oczyszczania użyto w kolejnym etapie.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.23 (t, $J = 7.2$, 3H, CH_2CH_3); 3.64 (s, 2H, PhSCH_2); 4.16 (qr, $J = 7.2$, 2H, CH_2CH_3); 7.21, 7.29 ($2 \times$ m, 1H i 2H, **Ph**: H_{para} i H_{meta}); 7.42 (m, 2H, **Ph**: H_{orto}).

2-Chloro-2-(fenyloctio)octan etylu (44)

Pochodną **44** otrzymano poprzez rodnikowe chlorowanie związku **43**. Użyto 40 mmol (8,07 g) pochodnej **43** oraz 40 mmol (5,5 g) NCS. Substraty ogrzewano do wrzenia w CCl_4 do czasu, aż *N*-chloroimid kwasu bursztynowego nie przereagował całkowicie. Wytrącony imid kwasu bursztynowego odsączono na gorąco, a z pozostałości usunięto rozpuszczalnik. Otrzymaną mieszaninę poddano chromatografii uzyskując częściowy rozdział składników. Jako eluenty zastosowano roztwory 10-20 % octanu etylu w heksanie. Otrzymano 3,5 g (15%) ciekłego, żółtawego produktu **44**.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.31 (t, $J = 7.2$, 3H, CH_2CH_3); 4.26 (qr, $J = 7.2$, 2H, CH_2CH_3); 5.57 (s, 1H, PhSCHCl); 7.42 (m, 3H, **Ph**: H_{para} i H_{meta}); 7.62 (m, 2H, **Ph**, H_{orto}).

5.4.2 Reakcja HWE między oksoaldehydem i karboanionem otrzymywanym z fosfonoamidowego prekursora reszty P1' (ścieżka III)

5.4.2.1 Przygotowanie acetonowego roztworu dimetylodioksiranu

W kolbie dwuszyjnej o pojemności 750 ml połączonej za pomocą polimerowego węża z drugą kolbą dwuszyjną ustawioną w alkoholowej łaźni chłodzącej, której temperaturę ($-90\text{ }^\circ\text{C}$) kontrolowano przy pomocy kriostatu, umieszczono 0,21 mola (17,64 g) NaHCO_3 . Kolbę tą ustawiono na mieszadle magnetycznym w łaźni lód/woda. Węglan zawieszono w 75 ml wody destylowanej, po czym do przesyconego roztworu dolano 60 ml acetonu o czystości analitycznej. Zawartość kolby intensywnie mieszano i dosypywano do niej oksonu ($2 \times \text{KHSO}_5 \times \text{KHSO}_4 \times \text{K}_2\text{SO}_4$) 0,06 mola (36,9 g) w porcjach po 6,15 g w odstępach 3 minut każda. Po dodaniu ostatniej porcji utleniacza, kolbę reakcyjną szczelnie zamknięto, a drugą, pełniącą rolę odbieralnika, podłączono do pompki wodnej o małej sprawności dającej podciśnienie około 100 mmHg. W ciągu 1 godziny oddestylowano 40 ml acetonowego roztworu DMDO. Kolbę z roztworem przeniesiono do łaźni lód/woda i po ogrzaniu dosypano do niej bezwodnego siarczanu sodu. Po 40 minutach roztwór przesączono do butelki zawierającej sita molekularne 4Å.

Tak przygotowany roztwór przechowywano w zamrażalniku w $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Miano otrzymanego roztworu szacowano przy pomocy spektroskopii $^1\text{H NMR}$. W tym celu do kolby 25 ml pobrano 0,22 mmola (25,8 μl) tioanizolu i potraktowano 1,10 ml otrzymanego roztworu DMDO. Szacowano jego stężenie na 0,1 M i wzięto niedomiar, aby uniknąć tworzenia się sulfonu i móc łatwo określić stężenie utleniacza na podstawie porównania intensywności sygnałów w widmie protonowym pochodzących od pierścieni aromatycznych wyjściowego tioeteru fenylometylowego i powstającego w wyniku utlenienia sulfotlenku. Widmo $^1\text{H NMR}$ mieszaniny zarejestrowano po 30 minutach od zmieszania reagentów. Obliczone na jego podstawie stężenie acetonowego roztworu DMDO wynosiło 0,044 M.

5.4.2.2 3-Fenylopropionnylo-Lys(Cbz)-CHN₂ (48)

Wymieniony w tytule diazometyloketon **48** otrzymywano z kwasu będącego produktem zasadowej hydrolizy estru **18a**, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 5.1.1. Etster **18a** (5,16 mmol, 2,20 g) hydrolizowano w metanolu używając pięciokrotnego nadmiaru NaOH (13,0 ml 2 M roztworu wodnego). Po 5 godzinach, na podstawie analizy TLC, stwierdzono całkowitą przemianę substratu. Produkt wytrącono przez zakwaszenie mieszaniny reakcyjnej przy pomocy 2 M HCl, po wcześniejszym odparowaniu metanolu. Uzyskany kwas wyekstrahowano trzema porcjami (30 ml) octanu etylu. Połączone warstwy organiczne suszono bezwodnym siarczanem sodu. Otrzymany roztwór w analizie TLC zawierał jeden produkt. Po oddzieleniu środka suszącego roztwór zagęszczono, a wytracający się osad odsączono (2,06 g, 97 %) i po wysuszeniu użyto w kolejnym etapie bez dodatkowych analiz.

Otrzymywanie diazometyloketonu **48** przebiegało zgodnie z procedurą 5.1.1. Użyto odpowiednio 5,0 mmol (2,06 g) kwasu uzyskanego z estru **18a**, 6,0 mmol (0,78 ml) chloromrówczanu izobutyłu i 6,3 mmol (0,70 ml) NMM do przygotowania mieszanego bezwodnika oraz 10,0 mmol (2,14 g) diazaldy, 0,66 g 85% KOH, 5 ml EtOH oraz 90 ml eteru dietylowego do przygotowania diazometanu. Mieszaninę reakcyjną po zagęszczeniu przemywano 5% roztworem NaHCO₃ i solanką, suszono nad bezwodnym siarczanem sodu i po oddzieleniu środka suszącego zagęszczono. Otrzymaną mieszaninę zawierającą pięć składników rozdzielono chromatograficznie. Zastosowano kolumnę wypełnioną silikazalem oraz roztwory heksanu w octanie etylu, kolejno od 50

do 10 % (objętościowo). Produkt w postaci żółtych kryształków (0,80 g) otrzymano z 37 % wydajnością.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.15 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.40, 1.50 ($2 \times$ m, 3H i 1H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.45 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 2.89 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 3.08 (m, CH_2NH); 4.37 (bs, 1H, CH); 4.73 (bs, 1H, CH_2NH); 5.01 (s, 2H, PhCH_2); 5.14 (s, 1H, CHN_2); 6.09 (bs, 1H, CHNH); 7.11-7.26 (m, 10H, $2 \times \text{C}_6\text{H}_5$).

5.4.2.3 7-*N*-benzyloksykarbonyloamino-2-okso-3-[(3-fenylopropionylo)amino]-heptanal (**49**)

Docelowy związek otrzymywano z bardzo niską wydajnością traktując diazometyloketon **48** acetonowym roztworem DMDO, który otrzymywano zgodnie z procedurą opisaną wyżej. Przed reakcją roztwór DMDO suszono dodatkowo siarczanem sodu, a do kolby reakcyjnej dodawano sita molekularnych 4Å. Diazometyloketon **48** (0,34 mmol, 150 mg) rozpuszczano w kolbie o objętości 25 ml w 1,0 ml bezwodnego acetonu i do roztworu dodawano sita molekularne 4Å. Następnie do mieszaniny wprowadzano strzykawką 0,45 mmol (8,9 ml acetonowego roztworu, około 0,045 M) DMDO mieszając zawartość kolby mieszadłem magnetycznym. W trakcie dodawania DMDO obserwowano wydzielanie się azotu. Reakcję kontynuowano 12 minut. Po tym czasie odparowywano lotne składniki mieszaniny, a pozostałość rozpuszczano w 2 ml bezwodnego THF i odparowywano do sucha. Tę operację powtarzano 3 razy. Ślady wody usuwano z roztworu siarczanem sodu oraz metodami fizycznymi: sita molekularne, azeotropowa destylacja z bezwodnymi rozpuszczalnikami. Porównanie widm mieszaniny poddanej takim operacjom z widmem surowej mieszaniny wykazało, że śladowa ilość oksoaldehydu **49** szacowana na podstawie sygnału pochodzącego od protonu aldehydowego ($\delta = 9.21$ ppm) w każdym przypadku była taka sama. W kilku powtórzeniach udało się otrzymać mieszaniny zawierające od 5 do 16% docelowego aldehydu.

5.4.3 Reakcja HWE między karboanionem otrzymywanym z β -ketofosfonianu i oksoaldehydowym prekursorem reszty P1' (ścieżka IV, sposób 1)

5.4.3.1 2-okso-2-[4-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)fenyloamino]octan metylu (**50**)

Ester **50** otrzymano acylując aminę **36** 2-chloro-2-oksooctanem metylu w obecności trójetyloaminy. Aminę **36** (11,0 mmol, 2,66 g) rozpuszczono w 50 ml bezwodnego THF

i przeniesiono do kolby (100 ml) zaopatrzonej we wkraplacz, ustawionej w łaźni lód/woda na mieszadle magnetycznym. Do schłodzonego w łaźni lód/woda roztworu wprowadzono 13,2 mmol (1,84 ml) trietyloaminy i po chwili rozpoczęto wkraplanie 12,1 milimola (1,11 ml) 2-chloro-2-oksooctanu metylu. Mieszanie kontynuowano 6 godzin, po czym z mieszaniny usunięto rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozrobiono z wodą i octanem etylu. Rozdzielono warstwy i organiczną przemyto 5% roztworem wodorowęglanu sodu, 5% roztworem kwasu cytrynowego oraz solanką. Fazę organiczną suszono siarczanem sodu. Po oddzieleniu środka suszącego przesącz zagęszczono i pozostawiono do krystalizacji. Produkt otrzymano z 90% wydajnością (3,2 g).

(CDCl₃, ppm): δ 3.99 (s, 3H, OCH₃); 5.22 (s, 2H, PhCH₂); 6.71 (bs, 1H, NH); 7.13 (m, 7H, C₆H₄ i Ph); 7.62 (d, $J = 2.1$, 2H, C₆H₄); 8.82 (bs, 1H, NH).

5.4.3.2 2-okso-2-[4-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)fenyloamino]etanol (**51**)

Ester **50** przekształcano w pochodną alkoholową **51** przy pomocy borowodoru sodu w obecności bezwodnego chlorku litu. Zastosowaną procedurę opisano dla alkoholu **20a**. Redukowano ilościowo 3 mmol (0,90 g) alkoholu przy pomocy 30 milimoli (1,13 g) NaBH₄ oraz 30 milimoli (1,26 g) LiCl. Po przeróbce jak dla alkoholu **20a** produkt krystalizowano z octanu etylu i wytrącano eterem dietylowym otrzymując 0,7 g czystego związku (95%) z wydajnością 78%.

¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 3.91 (s, 3H, CH₂OH); 4.98 (s, 2H, PhCH₂); 7.17 i 7.37 (2 × m, 9H, C₆H₄ i Ph); 8.56 i 8.62 (2 × bs, 2 × 1H, 2 × NH).

5.4.3.3 Próba otrzymywania 2-okso-2-[4-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)fenyloamino]etanolu (**I**)

Alkohol **51** poddano utlenianiu metodą Swerna, zgodnie z procedurą opisaną dla pochodnej **20a** używając odpowiednio 2,3 mmol alkoholu (0,70 g), 2,9 mmol (0,25 ml) chlorku oksalilu i 7,0 mmol (497 μ l) bezwodnego DMSO. Każdy z reagentów rozpuszczano w 2-3 ml bezwodnego chlorku metylenu. Po 1 godzinie od zmieszania reagentów dodawano 11,7 mmol (1,63 ml) trietyloaminy. Otrzymana mieszanina w obrazie TLC zawierała składniki nietrwale, reagujące w trakcie analizy albo ze złożem albo tlenem z powietrza. Na skomplikowanym widmie protonowego rezonansu

magnetycznego surowej mieszaniny nie zaobserwowano sygnału od ugrupowania aldehydowego.

5.4.3.4 2-okso-2-[4-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)fenyloamino]etanal (II)

Ester **50** poddano redukcji DIBAL-H w celu otrzymania aldehydu **52**. użytą procedurę opisano wyżej dla pochodnej **22a**. Redukowano 2,1 mmol (0,72 g) estru **50** przy pomocy 12,6 milimola (8,3 ml 1,5 M roztworu w toluenie) DIBAL-H. W mieszaninie po reakcji na podstawie widma protonowego rezonansu jądrowego nie stwierdzono obecności oczekiwanego aldehydu.

5.4.3.5 7-(*N*-benzyloksykarbonylo)amino-2-okso-3-(3-fenylopropanoamido)-heptylofosfonian dimetylu (**53a**)

Związek **49a** otrzymano bezpośrednio z pochodnej **18a** w reakcji z karboanionem generowanym z metylofosfonianu dimetylu przy pomocy *n*-BuLi. Do umieszczonej na mieszadle magnetycznym w łaźni alkoholowej kolby (250 ml) zaopatrzonej we wkraplacz z septą, barbotkę, dipol magnetyczny oraz kapilarę doprowadzającą azot, wprowadzono 60 ml roztworu metylofosfonianu dimetylu (7,44 g, 60 mmol) w bezwodnym THF. Łaźnię ochłodzono przy pomocy kriostatu do -70 °C i po upływie 20 minut do roztworu wkroplono 26,4 ml (66 mmol) 2,5 M roztworu *n*-BuLi w heksanie. Mieszanie kontynuowano 20 minut, po czym do kolby wkroplono 30 ml roztworu 10,7 mmol (4,40 g) estru **18a**. Reakcję prowadzono kolejne 3,5 godziny w tej samej temperaturze. Następnie mieszaninę ogrzano do około 5 °C i wkroplono do niej 70 ml nasyconego roztworu chlorku amonu. Wytrącający się osad odsączono i przemyto octanem etylu. Z przesączu odparowano rozpuszczalniki organiczne pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i przemyto ponownie roztworem chlorku amonu, a następnie solanką. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Uzyskaną mieszaninę poddano chromatografii kolumnowej. Wyjściowy ester eluowano roztworem 1:2 heksan/octan etylu, a właściwą pochodną fosforoorganiczną wypłukano 5% (v/v) roztworem metanolu w octanie etylu i po odparowaniu rozpuszczalników rekrystalizowano z układu octan etylu/heksan otrzymując 4,5 g końcowego związku.

Wydajność: 81%. T. t. 86-89 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.21 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.44 i 1.50 ($2 \times$ m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.58 i 1.86 ($2 \times$ m, 1H i 1H, CH_2P); 2.57 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 2.98 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 3.17 (m, 2H, CH_2NH); 3.74 ($2 \times$ d, $J = 7.8$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_3)_2$); 4.62 (m, 1H, CH); 5.07 (bs, 1H, CH_2NH); 5.09 (s, 2H, PhCH_2O); 6.79 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CONH); 7.21 7.27 i 7.35 ($3 \times$ m, 10H, $2 \times$ Ph).

^{31}P NMR (CDCl_3 , ppm): δ 22.34

5.4.3.6 7-(*N*-benzyloksykarbonyl)amino-2-okso-3-[*N*-(benzoilo)amino]-heptylofosfonian dimetylu (**53f**)

W celu otrzymania pochodnej **53f** zastosowano procedurę opisaną dla pochodnej **53a**. Użyto odpowiednio 3,26 mmol (1,30 g) estru **18f**, 19,5 mmol (2,09 ml) metylofosfonianu dimetylu, oraz 21,5 mmol (8,60 ml, 2,5 M roztwór w heksanie) *n*-BuLi. Produkt wydzielono chromatograficznie (silikażel, 10% octanu etylu w heksanie, następnie 5% octan etylu w heksanie, czysty octan etylu i octan etylu wzbogacony 5% (objętościowo) metanolu) jako bezbarwny olej i używano w kolejnym etapie bez dodatkowego oczyszczania (1,4g, 88%).

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.09 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.24 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.52 i 1.71 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.95 ($2 \times$ m, 3H, CH_2NH oraz CH_2P); 3.34 (m, 1H, CH_2P); 3.60 (d, $J = 11,4$ Hz, 3H, POCH_3); (d, $J = 12,3$ Hz, 3H, POCH_3); 3.87 (m, 1H, CH) 4.91 (m, 1H, CH_2NH); 5.01 (s, 2H, PhCH_2O); 5.25 (bd, $J = 7.7$ Hz, 1H, CONH); 7.27 (m, 5H, Ph). 7.38 (m, 3H, reszta benzoilowa) 7.76 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, reszta benzoilowa).

^{31}P NMR (CDCl_3 , ppm): δ 22.07.

5.4.3.7 6-(2,3-dibenzyloksykarbonyloguanidyno)-2-okso-3-(3-fenylpropanoamido)heksylofosfonian dimetylu (**54a**)

Związek **54a** otrzymano bezpośrednio z estru **19a** w reakcji z karboanionem generowanym z metylofosfonianu dimetylu przy pomocy *n*-BuLi wg procedury opisanej dla pochodnej **53a**. Do reakcji wzięto 40 ml roztworu metylofosfonianu dimetylu (1,76 g, 14,2 mmol) w bezwodnym THF, 5,70 ml (14,2 mmol) 2,5 M roztworu *n*-BuLi w heksanie. Mieszanie kontynuowano 20 minut, po czym do kolby wkroplono 20 ml roztworu 2,37 mmol (1,39 g) estru **19a**. Produkt izolowano przy pomocy chromatografii kolumnowej. Do elucji zastosowano kolejno roztwory 25%, 20%, 15%, 10% i 5% v/v heksanu w octanie etylu. Właściwą pochodną fosforoorganiczną

rekrystalizowano z układu octan etylu/heksan otrzymując 420 mg końcowego związku z wydajnością 26 %.

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.47 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.68 i 1.77 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.36 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 2.85 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 3.05 i 3.09 ($2 \times$ układ AB, $J = 14.4$ Hz, 2H, CH_2P); 3.74 (d, $J = 2.4$, 3H, OCH_3); 3.76 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H, OCH_3); 3.68 i 3.81 ($2 \times$ m, 1H i 1H, CH_2NH); 4.60 (m, 1H, CH); 5.14 (s, 2H, PhCH_2O); 5.26 (s, 2H, PhCH_2O); 7.11, 7.21, 7.34 i 7.40 ($4 \times$ m, 15H, $3 \times \text{C}_6\text{H}_5$); 7.29 (bs, 1H, CHNH); 9.33 i 9.50 ($2 \times$ bs, 1H i 1H, NH guanidynowe).

^{31}P NMR (CDCl_3 , ppm): δ 24.63.

5.4.4 Reakcja HWE między karboanionem otrzymywanym z β -ketofosfonianu i gliksalanem etylu (ścieżka IV, sposób 2)

5.4.4.1 Ester etylowy kwasu 9-*N*-benzyloksykarbonyloamino-4-okso-5-(*N*-(3-fenylopropionylo)amino)non-2-enowego (55a)

Nienasyconą pochodną **55a** otrzymywano w reakcji β -ketofosfonianu **53a** i handlowego gliksalanu etylu. Zastosowano modyfikację reakcji HWE polegającą na użyciu nieorganicznej zasady $\text{Ba}(\text{OH})_2$ do wygenerowania karboanionu z β -ketofosfonianu **53a**. Do kolby o objętości 50 ml odważono 1 mmol (0,52 g) β -ketofosfonianu **53a** i rozpuszczono go w 5 ml THF, po czym do roztworu dodano 1 mmol (0,315 g) aktywowanego $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (C200). Aktywowany wodorotlenek baru otrzymywano poprzez wyprażanie handlowego $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$ w 200°C przez 120 min i rozdrobnienie w młynku. Mieszaninę traktowano ultradźwiękami podwyższając jednocześnie temperaturę łaźni od 24 do 30°C w ciągu 30 minut. Następnie do mieszaniny wprowadzono 1 mmol (0,20 ml, 50% roztwór w toluenie) gliksalanu etylu. Mieszaninę sonifikowano kolejną godzinę, po czym mieszano przy pomocy mieszadła magnetycznego kontrolując postęp reakcji metodą TLC. Po 3 godzinach do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono dodatkowo 0,1 ekwiwalentu oksoaldehydu i sonifikowano kolejne 30 minut. Następnie z mieszaniny odsączono nierozpuszczalny osad nieorganiczny, a z pozostałości odparowano THF. Uzyskany materiał rozpuszczono w octanie etylu i przemywano 5% KHSO_4 , 5% NaHCO_3 i solanką, po czym suszono nad siarczanem magnezu. Produkty izolowano przy pomocy chromatografii stosując 45% roztwór octanu etylu w heksanie jako eluent. Otrzymano 110 mg izomeru *E* oraz 40 mg izomeru *Z*.

E 55a. T. t. 100-102 °C.

(CDCl₃, ppm): δ 1.17 i 1.22 (2 × m, 2H, CH₂CH₂CH); 1.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃); 1.46, 1.48, 1.50 i 1.87 (4 × m, 1H, 1H, 1H i 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.56 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 2.96 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 3.13 (m, 2H, CH₂NH); 4.28 (q, *J* = 7.2 Hz, CH₂CH₃); 4.87 (m, 2H, CH₂NH i CH); 5.08 (s, 2H, PhCH₂O); 6.29 (bd, *J* = 6.6 Hz, 1H, CONH); 6.81 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.15 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.18, 7.27 i 7.33 (3 × m 10H, 2 × Ph).

¹³C NMR (CDCl₃, ppm): δ 14.13 (CH₂CH₃); 21.91 (CH₂CH₂CH); 29.56 (CH₂CH₂CH₂CH); 30.65 (CH₂CH₂CH₂CH); 31.48 (PhCH₂CH₂); 38.02 (PhCH₂CH₂); 40.32 (CH₂NH); 57.07 (CH); 61.62 (CH₂CH₃); 66.68 (PhCH₂O); 126.31, 128.05, 128.14, 128.36, 128.55 (CH aromatyczne); 136.54 (C1 w PhCH₂O), 140.59 (C1 w PhCH₂CH₂); 132.81 (CHCOCHCH), 135.99 (CHCOCHCH); 156.63 (OCO); 165.06 (COOEt); 172.12 (COCH₂CH₂).

Z 55a T. t. 66,5-68 °C.

(CDCl₃, ppm): δ 1.16 (m 2H, CH₂CH₂CH); 1.18 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃); 1.43, 1.46, 1.59 i 1.87 (4 × m, 4 × 1H, CH₂CH₂CH₂CH); 2.46 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 2.88 (m, 2H, PhCH₂CH₂); 3.07 (m, 2H, CH₂NH); 4.11 (qr, *J* = 7.2 Hz, CH₂CH₃); 4.69 (m, 1H, i CH); 4.83 (m, 1H, CH₂NH); 5.06 (s, 2H, PhCH₂O); 5.96 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CHCOCHCH); 6.17 (bd, *J* = 7.2 Hz, 1H, CONH); 6.37 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.11, 7.19 i 7.24 (3 × m 10H, 2 × Ph).

¹³C NMR (CDCl₃, ppm): δ 14.13 (CH₂CH₃); 21.91 (CH₂CH₂CH); 29.56 (CH₂CH₂CH₂CH); 30.65 (CH₂CH₂CH₂CH); 31.48 (PhCH₂CH₂); 38.02 (PhCH₂CH₂); 40.32 (CH₂NH); 57.07 (CH); 61.62 (CH₂CH₃); 66.68 (PhCH₂O); 126.31, 128.05, 128.14, 128.36, 128.55 (CH aromatyczne); 136.54 (C1 w PhCH₂O), 140.59 (C1 w PhCH₂CH₂); 132.81 (CHCOCHCH), 135.99 (CHCOCHCH); 156.63 (OCO); 165.06 (COOEt); 172.12 (COCH₂CH₂).

5.4.4.2 Ester etylowy kwasu 5-[*N*-(benzoilo)amino]-9-*N*-benzyloksykarbonyloamino-4-okso-non-2-enowego (**55f**)

Tytułowy związek otrzymywano zgodnie z procedurą opisaną dla pochodnej **55a**. Użyto odpowiednio 2,2 mmol (1,10 g) β-ketofosfonianu **53f**, 2,2 mmol (0,70 g) Ba(OH)₂×8H₂O, oraz 2,6 mmol (0,52 ml 50% roztworu glioksalanu etylu w toluenie). Z mieszaniny otrzymanej po reakcji odsączono nierozpuszczalny osad i przemyto, jak w przypadku **51a**, a następnie oczyszczano chromatograficznie na silikażelu. Do elucji zastosowano chloroform. Ponieważ tą metodą nie udało się rozdzielić mieszaniny izomerów E/Z poddano ją dalszemu oczyszczaniu metodą HPLC na odwróconej fazie we wzrastającym gradiencie acetonitrylu w wodzie. Produkty otrzymano w postaci żółtawych, gęstych olejów. Ponieważ nie osiągnięto pełnego rozdziału izomerów, wydajność oszacowano dla mieszaniny i wyniosła ona około 20%.

E 55f ^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.23 (m i t, $J = 7.2$ Hz, 5H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ i CH_2CH_3); 1.33 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.45 i 1.67 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 3.03 (m, 2H, CH_2NH); 4.07 (m, 1H, CH); 4.18 (qr, $J = 7.2$ Hz, CH_2CH_3); 4.87 (bs, 1H, CH_2NH); 5.03 (s, 2H, PhCH_2O); 5.83 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CONH); 6.34 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 6.99 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.25 (m, 5H, **Ph**); 7.38 (m, 2H, H_{meta} pierścienia reszty benzoilowej); 7.43 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{para} pierścienia reszty benzoilowej); 7.73 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{orto} pierścienia reszty benzoilowej).

^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm): δ 14.10 (CH_2CH_3); 21.53 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 29.28 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 31.28 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 40.30 (CH_2NH); 60.80 (CH); 61.71 (CH_2CH_3); 66.72 (PhCH_2O); 127.10 (C2 i C6 pierścienia reszty benzoilowej), 128.13, 128.54 (CH w **Ph** reszty Cbz), 129.20 (C3 i C5 pierścienia reszty benzoilowej); 132.80 (C1 w pierścieniu reszty benzoilowej); 132.97 (CHCOCHCH); 134.95 (CHCOCHCH); 136.58 (C1 w PhCH_2O), 139.68 ($\text{C}(\text{O})$ reszty benzoilowej) 156.56 (OCO); 164.85 (COOEt); 196.61 (CHCO).

Z 55f ^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.23 (m i t, $J = 7.2$ Hz, 5H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ i CH_2CH_3); 1.34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.53 i 1.76 ($2 \times$ m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 3.03 (m, 2H, CH_2NH); 4.04 (qr, $J = 7.2$ Hz, CH_2CH_3); 4.05 (m, 1H, CH); 5.02 (bs, 1H, CH_2NH); 5.02 (s, 2H, PhCH_2O); 5.78 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CONH); 6.02 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 6.34 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.25 (m, 5H, **Ph**); 7.44 (m, 3H, H_{meta} pierścienia reszty benzoilowej oraz H_{para} pierścienia reszty benzoilowej); 7.73 (bs, 2H, H_{orto} pierścienia reszty benzoilowej).

5.4.4.3 Ester etylowy kwasu 8-(2,3-dibenzyloksykarbonylguanidyno)-4-oxo-5-(N-(3-fenylpropionylo)amino)okt-2-enowego (56a)

Nienasyconą pochodną **56a** otrzymywano w reakcji β -ketofosfonianu **54a** i gliksalanu etylu. Zastosowano modyfikację reakcji HWE, jak w przypadku pochodnych **55a** i **55f**. Użyto odpowiednio 0,6 mmol (0,42 g) fosfonianu **54a**, 0,6 mmol (120 μl , 50% roztworu w toluenie), gliksalanu etylu oraz 0,6 mmola (194 mg) $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. Produkty **Z** i **E** oczyszczono wstępnie przy pomocy chromatografii kolumnowej stosując kolejno roztwory 25% i 30% v/v octanu etylu w heksanie. Wyodrębnione frakcje były mieszaninami zawierającymi przynajmniej po dwa główne składniki. Dlatego poddano je dalszemu rozdzieleniu przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej na odwróconej fazie we wzrastającym gradiencie acetonitrylu w wodzie. Niska wydajność reakcji oraz wieloetapowa procedura oczyszczania γ -okso- α,β -nienasyconych estrów przyczyniająca się do dalszych strat masy spowodowały, że produkty izolowano w ilościach analitycznych.

Z 52a ^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 1.49 1.56 (2 \times m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.73 i 1.83 (2 \times m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.35 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 2.85 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 3.67 i 3.83 (2 \times m, 1H i 1H, CH_2NH); 4.17 (qr, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 4.74 (m, 1H, CH); 5.10 (s, 2H, PhCH_2O); 5.25 (s, 2H, PhCH_2O); 5.85 (d, $J = 12$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 6.37 (d, $J = 12$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.11 (bs, 1H, CHNH); 7.10, 7.22 i 7.36 i (3 \times m, 15H, C_6H_5); 9.35 i 9.50 (2 \times bs, 1H i 1H, NH guanidynowe).

^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm): δ 13.97 (CH_2CH_3); 24.33 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 25.36 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 31.33 (PhCH_2CH_2); 37.67 (PhCH_2CH_2); 44.14 (CH_2NH); 57.93 (CH); 61.27 (CH_2CH_3); 67.20 i 68.99 (PhCH_2O); 125.87 (CHCOCHCH); 126.09, 128.19, 128.35, 128.39, 128.45, 128.56, 128.86, 128.94 (CH aromatyczne); 134.63, 136.39, 140.56 (C1 pierścieni benzenowych); 140.81 (CHCOCHCH); 155.76 (CH_2OCO); 160.78 ($\text{NHC}(\text{NCbz})$); 163.58 (CH_2OCO); 165.30 (COOEt); 172.22 (NHCOCOCH_2); 201.96 (CHCOCHCH).

E 52a ^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 1.41 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.57 i 1.68 (2 \times m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.35 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 2.77 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 3.62 i 3.76 (2 \times m, 1H i 1H, CH_2NH); 4.19 (qr, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 4.60 (m, 1H, CH); 5.12 (s, 2H, PhCH_2O); 5.21 (s, 2H, PhCH_2O); 6.69 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.11 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.28 (bs, 1H, CHNH); 7.02, 7.11 i 7.33 i (3 \times m, 15H, C_6H_5); 9.35 i 9.50 (2 \times bs, 1H i 1H, NH guanidynowe).

^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm): δ 14.10 (CH_2CH_3); 24.08 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 25.92 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 31.43 (PhCH_2CH_2); 37.43 (PhCH_2CH_2); 45.05 (CH_2NH); 57.53 (CH); 61.53 (CH_2CH_3); 68.59 i 70.26 (PhCH_2O); 126.11 (C4 z PhCH_2CH_2); 126.35, 128.36, 128.41, 128.54, 128.45, 128.64, 128.72, 128.93, 129.00, 129.16, 129.38 (CH aromatyczne); 132.57 (CHCOCHCH); 135.72 (CHCOCHCH); 140.43, (C1 aromatyczne w PhCH_2CH_2); 154.97 (CH_2OCO); ($\text{NHC}(\text{NCbz})$); 165.17 (COOEt); 173.78 (NHCOCOCH_2); 196.74 (CHCOCHCH).

5.4.4.4 Usuwanie grup ochronnych z otrzymanych γ -okso- α,β -nienasyconych estrów

Benzyloksykarbonylową resztę ochronną końcowych grup aminowych izomerów *Z* i *E* pochodnych **55a**, **55f** oraz **56a** usuwano zgodnie z procedurami ogólnymi opisanymi w podrozdziałach 5.1.4 i 5.1.5.2. Ten sam produkt, izomer *E*, izolowany w każdym przypadku przy pomocy HPLC stanowił główny składnik rozdzielanej mieszaniny. Zastosowane kwaśne warunki odblokowania uniemożliwiają izolowanie izomeru *Z*, który prawdopodobnie w obecności TFA ulega protonowaniu, a następnie w reakcji ze sprzężoną zasadą (anion trójfluorooctanowy) oddaje proton przyjmując korzystniejszą termodynamicznie geometrię *E*. Do reakcji wzięto czysty (98%) izomer *Z*. Po reakcji z mieszaniny izoluje się w 99% izomer *E*. Na widmie protonowego rezonansu magnetycznego widać resztkowe sygnały pochodzące od izomeru *Z*, który wykazuje podobne powinowactwo do złoza C18 i ma zbliżony czas retencji do izomeru *E*.

Ester etylowy kwasu 9-amino-4-okso-5-(*N*-(3-fenylpropionylo)amino)non-2-enowego (57a)

HPLC: $t_R = 21.17$ min; gradient ($t[\text{min}] - \%B$): 0' – 5%; 22' – 55%; 26' – 65%.

^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.05 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.22 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 1.46, 1.65 (2 \times m, 3H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.56 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, PhCH_2CH_2); 2.80 (m, 2H, CH_2NH); 2.82 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 4.19 (qr, $J = 7.2$ Hz, CH_2CH_3); 4.41 (m, 1H, CH); 6.64 (dd, $J_1 = 0.6$ Hz, $J_2 = 15.6$, 1H, CHCOCHCH); 7.04 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.14 i 7.22 (2 \times m, 5H, *Ph*).

^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm): δ 13.20 (CH_2CH_3); 21.75 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 26.24 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 28.50 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 31.04 (PhCH_2CH_2); 36.69 (PhCH_2CH_2); 39.10 (CH_2NH); 57.62 (CH); 62.63 (CH_2CH_3); 126.43, 128.45, 128.62, (CH aromatyczne); 140.25 (C1 w PhCH_2CH_2); 132.20 (CHCOCHCH); 136.12 (CHCOCHCH); 167.03 (COOEt); 175.69 (COCH_2CH_2); 199.69 (COCHCH).

Ester etylowy kwasu 9-amino-4-okso-5-(*N*-(benzoilo)amino)non-2-enowego (57f)

HPLC: $t_R = 19.6$ min; gradient ($t[\text{min}] - \%B$): 0' – 5%; 22' – 55%; 26' – 65%.

E 53f ^1H NMR (D_2O , ppm): δ 1.19 (m i t, $J = 7.2$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ i CH_2CH_3); 1.22 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.45 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.45 i 1.66 (2 \times m, 1H i 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.80 (m, 2H, CH_2NH); 4.16 (m, 1H, CH); 4.16 (qr, $J = 7.2$ Hz, CH_2CH_3); 6.41 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 6.98 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.46 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{meta} pierścienia reszty benzoilowej); 7.43 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{para} pierścienia reszty benzoilowej); 7.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_{orto} pierścienia reszty benzoilowej).

13.20 (CH_2CH_3); 21.74 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 26.05 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 29.90 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 39.09 (CH_2NH); 60.54 (CH); 62.63 (CH_2CH_3); 126.75 (C2 i C6 pierścienia reszty benzoilowej); 129.56 (C3 i C5 pierścienia reszty benzoilowej); 132.32 (CHCOCHCH); 133.76 (C1 w pierścieniu reszty benzoilowej); 135.28 (CHCOCHCH); 138.53 (C(O) reszty benzoilowej); 166.67 (COOEt); 199.76 (CHCO).

Ester etylowy kwasu 8-guanidyno-4-oxo-5-(*N*-(3-fenylpropionylo)amino)okt-2-enowego (58a)

HPLC: $t_R = 22.08$ min; gradient ($t[\text{min}] - \%B$): 0' – 5%; 15' – 35%; 26' – 50%;

^1H NMR (CDCl_3 , ppm): δ 1.49 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 1.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 1.38 i 1.65 (2 \times m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 2.54 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 2.83 (m, 2H, PhCH_2CH_2); 2.93 (m, 2H, CH_2NH); 4.17 (qr, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 4.41 (m, 1H, CH); 6.63 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.03 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CHCOCHCH); 7.12 (m, 3H, 2 \times H_{meta} , H_{para}); 7.20 (m, 2H, 2 \times H_{orto}).

^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm): δ 13.14 (CH_2CH_3); 23.96 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 26.09 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$); 31.01 (PhCH_2CH_2); 36.69 (PhCH_2CH_2); 40.35 (CH_2NH); 57.20 (CH); 62.52 (CH_2CH_3); 126.34 (CH aromatyczne, C4); 128.37, 128.51 (CH aromatyczne, C3 i C5 oraz C2 i C6); 132.16 (CHCOCHCH); 136.10 (CHCOCHCH); 140.10 (C1 aromatyczne); 156.57 (NHC=N); 166.9 (COOEt); 175.53 (NH_aCOCH_2); 199.14 (CHCOCHCH).

6 WYKAZ SKRÓTÓW, AKRONIMÓW I OZNACZEŃ STOSOWANYCH W TEKŚCIE

6.1 Enzymy i inhibitory:

C-koniec:	koniec karboksylowy łańcucha peptydowego enzymu lub substratu/inhibitora
E-Cys-S⁻:	symboliczne oznaczenie proteazy cysteinowej
HRV-3C^{PRO}	proteaza 3C ludzkiego rinowirusa
ICE:	enzym konwertujący interleukinę
IgSF:	nadrodzina immunogloblin
Kgp:	gingipaina K
kalp:	kalpaina
kasp:	kaspaza
N-koniec:	koniec aminowy łańcucha peptydowego enzymu lub substratu/inhibitora
PDB:	baza danych zawierająca informacje o strukturze i własnościach scharakteryzowanych dotychczas białek
P1, P2,...Pn:	oznaczenia reszt komplementarnych do odpowiednich wnęk wiążących enzymu oznaczanych Sn w kierunku od hydrolizowanego wiązania do końca aminowego liganda
P1', P2',...Pn':	oznaczenia reszt komplementarnych do odpowiednich wnęk wiążących enzymu oznaczanych Sn' w kierunku od hydrolizowanego wiązania do końca karboksylowego liganda
RgpB:	gingipaina R2
Xaa:	oznaczenie dowolnej reszty aminokwasowej w peptydzie

6.2 Kinetyka enzymatyczna

BD:	brak danych
EC₅₀:	stężenie skuteczne zastosowanej substancji, przy którym u połowy populacji badanych osobników obserwuje się określony efekt
IC₅₀:	stężenie połowicznego zahamowania
k_{cat}:	w modelu Michaelisa-Menten tzw. szybkość obrotów wyrażana jako iloraz szybkości maksymalnej w reakcji enzymatycznej i wartości całkowitego stężenia enzymu
K_m:	stała Michaelisa-Menten
k_{obs}:	stała szybkości reakcji pseudopierwszego rzędu
NO:	nie oznaczano

6.3 Nazwy chemiczne

ATP:	adenozynotrifosforan
Boc:	reszta <i>tert</i> -butyloksykarbonylowa

BOP:	heksafluorofosforan benzotriazolo-1-yl-oksy-tris-(dimetyloamino)fosfonowy
Cbz:	reszta benzyloksykarbonylowa
(COCl)₂:	chlorek oksalilu
DBU:	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DIBAL-H:	wodorek diizobutyloglinowy
DMDO:	dimetylo-dioksyran
DMSO:	dimetylosulfotlenek
Et₃N	trietyloamina
GABA:	kwasy γ -aminomasłowy
HBTU:	heksafluorofosforan <i>O</i> -benzotriazol-1-yl- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylouroniowy
HPLC:	wysokosprawną chromatografię cieczą
HWE:	reakcja olefinacji H ornera- W adswortha- E mmonsa
HSAB:	(ang. H ard S oft A cid B ase) reguła opisująca reaktywność odpowiednich związków w zależności od grupy funkcyjnej decydującej o ich przynależności do tzw. miękkich/twardych kwasów/zasad
<i>i</i>-Pr₂NEt:	diizopropylodimetyloamina
LAH:	glinowodorek litu
LDA:	diizopropylodimetyloamid litu
LiHMDS:	<i>N,N</i> -bis(trimetylosililo)amid litu
<i>n</i>-BuLi:	<i>n</i> -butylolit
NCS:	<i>N</i> -chloroimid kwasu bursztynowego
NMM:	<i>N</i> -metylmorfolina
Ph:	fenyl
TFA:	kwasy trójfluorooctowe
TFMK:	trifluorometyloketon(y)
THF:	tetrahydrofuran
TLC:	chromatografia cienkowarstwowa
TMSCl:	trimetylochlorosilan

7 Literatura

1. Barrett, A. J.; Rawlings, N. D.; Woessner, J. F. Jr. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press. London, **1998**,
2. Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2001**, 11, 2, 221-259
3. Travis, J.; Potempa, J. *Biochym. Biophys. Acta* **2000**, 1477, 35-50
4. Miyoshi, S. I.; Shinoda, S. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* **1997**, 16, 177-194
5. Maeda, H. *Microbiol. Immunol.* **1996**, 40, 685-699
6. Rice, S. A.; Givskov, M.; Steinberg, P.; Kjelleberg, S. *Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 1 23-31
7. Wright, G. D. *Chem. Biol.* **2000**, 7, R127-R132
8. Zejc, A.; Gorczyca, M. *Chemia Leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa **1999**, rozdz. 11.3, 600-658
9. Otto, H.-H.; Schirmeister, T. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 133-171
10. Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, Ö. D.; James, K. E. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4639-4750
11. Leung-Toung, R.; Zhao, Y.; Li, W.; Tam, T. F.; Karimian, K.; Spino, M. *Current Medicinal Chemistry*, **2006**, 13, 547-581
12. Anderson, A. C. *Chemistry & Biology*, **2003**, 10, 787-797
13. Zheng, D.; Huang, Y.; Moseley, H.; Xiao, R.; Aramini, J.; Swapna, G.; Montelione, G. *Protein Sci.* **2003**, 12, 1232-1246
14. Bailey-Kellogg, C.; Widge, A.; Kelley, J.; Berardi, M.; Bushweller J.; Donald, B. *J. Comput. Biol.* 2000, 7, 537-558
15. Verlinde, C.; Hol, W. *Structure* 2, **1994**, 577-587
16. Schechter, I.; Berger A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27, 2, 157-162.
17. Krantz, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 11, 1327-1334
18. Lewis, C.; Wolfenden, R. *Biochemistry* **1977**, 16, 4890-4895
19. Gamcsik, M.; Malthouse, P.; Primrose, W.; Mackenzie, N.; Boyd, A.; Russell, R.; Scott, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 6324-6325.
20. Dufour, E.; Storer, A.; Menard, R. *Biochemistry* **1995**, 34, 9136-9143
21. Hanzlik, R. P.; Zygmunt, J.; Moon, J.B. *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1035, 62-70
22. Liang, T.-C.; Abeles, R. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, 252, 626-634
23. Mackenzie, N. E.; Grant, S. K.; Scott, A. I.; Malthouse, J. P. G. *Biochemistry* **1986** 25, 2293-2298
24. Kraut, J. *Annu. Rev. Biochem* **1977**, 46, 331 -358
25. Westerik, J. O.; Wolfenden, R. *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 8195-8197
26. Denault, J. B.; Salvesen, G. S. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4489-4500
27. Yuan, J.; Yankner, B. A. *Nature* **2000**, 407, 802-809.
28. Linton, S. D.; Karanewsky, D. S.; Ternansky, R. J.; Wu, J. C.; Pham, B.; Kodandapani, L.; Smidt, R.; Diaz, J. L.; Fritz, L C.; Tomaselli, K. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 20, 2969-2971
29. Linton, S. D.; Karanewsky, D. S.; Ternansky, R. J.; Chen, N.; Guo, X.; Jahangiri, K. G.; Kalish, V. J.; Meduna, S. P.; Robinson, E. D.; Ullman, B. R.; Wu, J. C.; Pham, B.; Kodandapani, L.; Smidt, R.; Diaz, J. L.; Fritz, L. C.; von Krosigk, U.; Roggo, S.; Schmitz, A.; Tomaselli, K. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 20, 2973-2975

30. Barrett, A.; Salvesen, G. *Proteinase Inhibitors*; Elsevier: Amsterdam, **1986**, 3-22
31. Rich, D.; Brown, M.; Barrett, A. *Biochem. J.* **1986**, 235, 731-734
32. Trainor, D. *Trends Pharmacol. Sci.* **1987**, 8, 303
33. Imperiali, B.; Abeles, R. *Biochemistry* **1986**, 25, 3760-3767
34. Linderman, R.; Tennyson, S.; Shultz, D. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 6437-6440
35. Angelastro, M.; Mehdi, S.; Burkhart, J.; Peet, N.; Bey, P. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 11-13
36. Li, Z.; Patil, G.; Golubski, Z.; Hori, H.; Tehrani, K.; Foreman, J.; Eveleth, D.; Bartus, R.; Powers, J. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 3472-3480
37. Hu, L.-Y.; Abeles, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, 281, 271-274
38. Harbeson, S.; Abelleira, S.; Akiyama, A.; Barrett, R., III; Carroll, R.; Straub, J.; Tkacz, J.; Wu, C.; Musso, G. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2918-2929
39. Ray, S. K.; Banik, N. L. *Curr. Drug Target CNS Neurol. Disord.* **2003**, 2, 3, 173-189
40. Donkor, I.O. *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 12, 1171-1188
41. Huang, Y.; Wang, K. K. *Trends Mol. Med.* **2001**, 7, 8, 355-362
42. Trumbeckaite, S.; Neuhof, C.; Zierz, S.; Gellerich, F. N. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65, 5, 911-916
43. Inoue, J.; Nakamura, M.; Cui, Y. S.; Sakai, Y.; Sakai, O.; Hill, J. R.; Wang, K. K.; Yuen, P. W. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5, 868-871
44. Tamada, Y.; Fukiage, C.; Mizutani, K.; Yamaguchi, M.; Nakamura, Y.; Azuma, M.; Shearer, T. R. *Curr. Eye Res.* **2001**, 22(4), 280-285
45. Sakamoto, Y. R.; Nakajima, T.R.; Fukiage, C. R.; Sakai, O. R.; Yoshida, Y. R.; Azuma, M. R.; Shearer, T. R. *Curr. Eye Res.* **2000**, 21, 1, 571-580
46. Kupina, N. C.; Nath, R.; Bernath, E. E.; Inoue, J.; Mitsuyoshi, A.; Yuen, P. W.; Wang, K. K.; Hall, E. D. *J. Neurotrauma* **2001**, 18, 11, 1229-1240
47. Nakamura, M.; Inoue, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 12, 1603-1606
48. Nakamura, M.; Yamaguchi, M.; Sakai, O.; Inoue, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 7, 1371-1379
49. Carillo, S.; Pariat, M.; Steff, A. M.; Roux, P.; Etienne-Julan, M.; Lorca, T.; Piechaczyk, M. *Oncogene* **1994**, 9, 1679-1689
50. Sorimachi, H.; Ishiura, S.; Suzuki, K. *Biochem. J.* **1997**, 328, 721-732
51. Atencio, I. A.; Ramachandra, M.; Shabram, P.; Demers, G. W. *Cell Growth Differ.* **2000**, 11, 247-253
52. Gil-Parrado, S.; Fernandez-Montalvan, A.; Assfalg-Machleidt, I.; Popp, O.; Bestvater, F.; Holloschi, A.; Knoch, T. A.; Auerswald, E. A.; Welsh, K.; Reed, J. C.; Fritz, H.; Fuentes-Prior, P.; Spiess, E.; Salvesen, G. S.; Machleidt, W. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 27217-27226
53. Kitada, S.; Anderson, J.; Akar, S., et al. *Blood* **1998**, 91, 3379-3389
54. Wood, D. E.; Thomas, A.; Devi, L. A.; Berman, Y.; Beavis, R. C.; Reed, J. C.; Newcomb, E.W. *Oncogene* **1998**, 17, 1069-1078
55. Wang, K. K.; Yuen, P.W. *Adv. Pharmacol.* **1997**, 37, 117-152
56. Korukonda, R.; Guan, N.; Dalton, J. T.; Liu, J.; Donkor, I. O. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5282-5290
57. Tripathy, R.; Gu, Z.-Q.; Dunn, D.; Senadhi, S. E.; Ator, M. A.; Chatterjee, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 19, 2647-2652
58. Inoue, J.; Nakamura, M.; Cui, Y.-S.; Sakai, Y.; Sakai, O.; Hill, J. R.; Wang, K. K. W.; Yuen, P.-W. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 868-871

59. Lubisch, W.; Beckenbach, E.; Bop, S.; Hofmann, H.-P.; Kartal, A.; Kastel, C.; Lindner, T.; Garrecht-Metz, M.; Reeb, J.; Ferdinand, R.; Vierling, M.; Moller, A. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2404-2412
60. Shaw, E. *Adv. Enzymol.* wydawca Meister, A.; J. Wiley & Sons: New York, **1990**, 63, 271-347
61. Burgaud, J. L.; Riffaud, J. P.; *Del Soldato. Curr. Pharm. Des.* **2002**, 8, 3, 201-213
62. Fiorucci, S. *Trends Immunol.* **2001**, 22, 5, 232-235
63. Ascenzi, P.; Salvati, L.; Polticelli, M.; Venturini, G. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2001**, 2, 2, 137-153
64. Brüne, B.; Mohr, S. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2001**, 2, 1, 61-72
65. Zech, B.; Kohl, R.; von Knethen, A.; Brüne, B. *Biochem. J.* **2003**, 371, Pt 3, 1055-1064
66. Lowe, G.; Yuthavong, Y. *Biochem. J.* **1971**, 124, 107-115
67. Moon, J.; Coleman, R.; Hanzlik, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 1350-1351
68. Greenspan, P. D.; Clark, K. L.; Tommasi, R. A.; Cowen, S. D.;
69. McQuire, L. W.; Farley, D. L.; van Duzer, J. H.; Goldberg, R. L.; Zhou, H.; Du, Z.; Fitt, J. J.; Coppa, D. E.; Fang, Z.; Macchia, W.; Zhu, L.; Capparelli, M. P.; Goldstein, R.; Wigg, A. M. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 4524-4534
70. Ward, Y. D.; Thomson, D. S.; Frye, L. L.; Cywin, C. L.; Morwick, T.; Emmanuel, M. J.; Zindell, R.; McNeil, D.; Bekkali, Y.; Girardot, M.; Hrapchak, M.; DeTuri, M.; Crane, K.; White, D.; Pav, S.; Wang, Y.; Hao, M.-H.; Grygon, C. A.; Labadia, M. E.; Freeman, D. M.; Davidson, W.; Hopkins, J. L.; Brown, M. L.; Spero D. M. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5471-5482.
71. Pearson, R. *Chemical Hardness*, Wiley-VCH, 1997, strony 3-4
72. Asboth, B.; Polgar, L. *Biochemistry* **1983**, 22, 117-122
73. Krauser, J. A.; Powers, J. C. *Peptide Aldehydes. In Hoben-Weyl Methods of Organic Chemistry*, Vol. E22c *Synthesis of Peptidometics*; Goodman, M., Felix, A., Moroder, L., Toniolo, C., Eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2002; strony 199-217
74. Lecaille, F.; Kaleta, J.; Brömme, D. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4459-4488
75. Turk, B.; Turk, D.; Turk, V. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1477, 98-111
76. Nägler, D. K.; Menard, R. *Biol. Chem.* **2003**, 384, 837-843
77. Grzonka, Z.; Jankowska, E.; Kasprzykowski, F.; Lankiewicz, L.; Wicz, W.; Wiczczak, E.; Ciarkowski, J.; Drabik, P.; Janowski, R.; Kozak, M.; Jaskolski, M.; Grubb, A. *Acta Biochim. Pol.* **2001**, 48, 1-20
78. Ravanko, K.; Järvinen, K.; Helin, J.; Kalkkinen, N.; Hölttä, E. *Cancer Res.* **2004**, 64, 8831-8838
79. Rousselet, N.; Mills, L.; Jean, D.; Tellez, C.; Bar-Eli, M.; Frade, R. *Cancer Res.* **2004**, 64, 146-151
80. Yang, H.; Kala, M.; Scott, B. G.; Goluszko, E.; Chapman, H. A.; Christadoss, P. *J. Immunol.* **2005**, 174, 1729-1737
81. Brömme, D.; Okamoto, K.; Wang, B. B.; Biroc, S. *J. Biol. Chem.* **1998**, 271, 2126-2132
82. Greenspan, P. D.; Clark, K. L.; Tommasi, R. A.; Cowen, S. D.; McQuire, L. W.; Farley, D. L.; van Duzer, J. H.; Goldberg, R. L.; Zhou, H.; Du, Z.; Fitt, J. J.; Coppa, D.E.; Fang, Z.; Macchia, W.; Zhu, L.; Michael P. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 4524-4534
83. Malthouse, J.; Mackenzie, N.; Boyd, A.; Scott, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 1685-1686

84. Jia, Z.; Hasnai, S.; Hirama, T.; Lee, X.; Mort, J.; To, R.; Huber, C. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 5527-5533
85. Ullman, B. R.; Aja, T.; Deckwerth, T. L.; Diaz, J. L.; Herrmann, J.; Kalish, V. J.; Karanewsky, D. S.; Meduna, S. P.; Nalley, K.; Robinson, E. D.; Roggo, S. P.; Sayers, R. O.; Schmitz, A.; Ternansky, R. J.; Tomaselli, K. J.; Wu, J. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 20, 3623-3626
86. Krantz, A. *Methods Enzymol.* **1994**, 244, 656-671
87. Krantz, A.; Copp, L. J.; Coles, P. J.; Smith, R. A.; Heard, S. B. *Biochemistry* **1991**, 30, 19, 4678-4687
88. Rasnick, D. *Anal. Biochem.* 1985, 149, 2, 461-465
89. Rasnick, D. *Perspect. Drug Disc. Des.* **1996**, 6, 47-63
90. Hoglen, N. C.; Hirakawa, B. P.; Fisher, C. D.; Weeks, S.; Srinivasan, A.; Wong, A. M.; Valentino, K. L.; Tomaselli, K. J.; Bai, X.; Karanewsky, D. S.; Contreras, P. C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 297, 2, 811-818
91. Yang, W.; Guastella, J.; Huang, J. C.; Wang, Y.; Zhang, L.; Xue, D.; Tran, M.; Woodward, R.; Kasibhatla, S.; Tseng, B.; Drewe, J. Cai, S. X. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, 140, 2, 402-412
92. McKerrow, J. H. *Int. J. Parasitol.* **1999**, 29, 6, 833-837
93. Crawford, C.; Mason, R.; Wikstrom, P.; Shaw, E. *Biochem. J.* **1988**, 253, 751-758
94. Brocklehurst, K.; Malthouse, J. *Biochem. J.* **1978**, 175, 761-764
95. Mason, R.; Bartholomew, L.; Hardwick, B. *Biochem. J.* **1989**, 263, 945-949
96. Björck, L.; Akesson, P.; Bohus, M.; Trojnar, J.; Abrahamson, M.; Olafsson, I.; Grubb, A. *Nature* **1989**, 337, 385-386
97. Ambroso, J.; Harris, C. *Teratology* **1994**, 50, 214-228
98. Honn, K.; Cavanaugh, P.; Evens, C.; Taylor, J.; Sloane, B. *Science* **1982**, 217, 540-542
99. Pliura, D.; Bonaventura, B.; Smith, R.; Coles, P.; Krantz, A. *Biochem. J.* **1992**, 288, 759-762
100. Wagner, B.; Smith, R.; Coles, P.; Copp, L.; Ernest, M.; Krantz, A. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1833-1840
101. Revesz, L.; Briswalter, C.; Heng, R.; Leutwiler, A.; Müller, R.; Wüthrich, H.-J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9693-9696
102. Smith, R.; Copp, L.; Coles, P.; Pauls, H.; Robinson, V.; Spencer, R.; Heard, S.; Krantz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4429-4431
103. Hanada, K.; Tamai, M.; Yamagishi, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Tanaka, I. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 523-528
104. Hanada, K.; Tamai, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Seki, T.; Tanaka, I. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 529-536
105. Barrett, A.; Kembhavi, A.; Brown, M.; Kirschke, H.; Knight, C.; Tamai, M.; Hanada, K. *Biochem. J.* **1982**, 201, 189-198
106. Hanada, K.; Tamai, M.; Morimoto, S.; Adachi, T.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Tanaka, I. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, 42, 537-541
107. Yabe, Y.; Guillaume, D.; Rich, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4043-4044
108. Matsumoto, K.; Yamamoto, D.; Ohishi, H.; Tomoo, K.; Ishida, T.; Inoue, M.; Sadatome, T.; Kitamura, K.; Mizuno, H. *FEBS Lett.* **1989**, 245, 177-180
109. Gour-Salin, B.; Lachance, P.; Plouffe, C.; Storer, A.; Menard, R. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 720-725

110. Sumiya, S.; Yoneda, T.; Kitamura, K.; Murata, M.; Yokoo, C.; Tamai, M.; Yamamoto, A.; Inoue, M.; Ishida, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 299-303
111. Turk, D.; Podobnik, M.; Popovic, T.; Katunuma, N.; Bode, W.; Huber, R.; Turk, V. *Biochemistry* **1995**, 34, 4791-4797
112. Sugita, H.; Ishiura, S.; Suzuki, K.; Imahori, K. *J. Biochem.* **1980**, 87, 339-341
113. Hashida, S.; Towatari, T.; Kominami, E.; Katunuma, N. *J. Biochem.* **1980**, 88, 1805-1811.
114. Buttle, D.; Saklatvala, J.; Tamai, M.; Barrett, A. *Biochem. J.* **1992**, 281, 175-177
115. Ishiura, S.; Nonaka, I.; Sugita, H. *J. Biochem.* **1981**, 90, 283-285
116. *Drugs Future* **1986**, 11, 927-930
117. *Drugs Future* **1990**, 15, 1128
118. *Drugs Future* **1991**, 16, 1040
119. Miyahara, T.; Shimojo, S.; Toyohara, K.; Imai, T.; Miyajima, M.; Honda, H.; Kamegai, M.; Ohzeki, M.; Kokatsu, J. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **1985**, 16, 537-546
120. Fukushima, K.; Arai, M.; Kohno, Y.; Suwa, T.; Satoh, T. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1990**, 105, 1, 1-12
121. Tachikura, T. *Acta Paediatr. Jpn.* **1990**, 32, 5, 495-501
122. Montaser, M.; Lalmanach, G.; Mach, L. *Biol. Chem.* **2002**, 383, (7-8), 1305-1308
123. Eilon, G. F.; Gu, J.; Slater, L. M.; Hara, K.; Jacobs, J. W. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2000**, 45, 3, 183-191
124. *Drugs Fut.* **2000**, 25, 1215
125. Schaschke, N.; Deluca, D.; Assfalg-Machleidt, I.; Hohnke, C.; Sommerhoff, C. P.; Machleidt, W. *Biol. Chem.* **2002**, 383, 5, 849-852
126. Schaschke, N.; Assfalg-Machleidt, I.; Machleidt, W.; Lassleben, T.; Sommerhoff, C. P.; Moroder, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 7, 677- 680
127. Schaschke, N.; Assfalg-Machleidt, I.; Lassleben, T.; Sommerhoff, C. P.; Moroder, L.; Machleidt, W. *FEBS Lett.* **2000**, 482, 1-2, 91- 96
128. James, K. E.; Asgian, J. L.; Li, Z. Z.; Ekici, Ö. D.; Rubin, J. R.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1553-1574
129. Moroder, L.; Musiol, H.-J.; Scharf, R. *FEBS Lett.* **1992**, 299, 51-53
130. Hanzlik, R.; Thompson, S. *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 711-712
131. Thompson, S.; Andrews, P.; Hanzlik, R. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 104-111
132. Palmer, J.; Rasnick, D.; Klaus, J.; Brömme, D. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3193-3196
133. Brömme, D.; Klaus, J.; Okamoto, K.; Rasnick, D.; Palmer, J. *Biochem. J.* **1996**, 315, 85-89
134. Anderson, B.; Vasini, E. *Biochemistry* **1970**, 9, 3348-3352
135. Hendley, J. O. *Adv. Virus Res.* **1999**, 54, 453-466
136. Dragovich, P. S. *Exp. Opin. Ther. Pat.* **2001**, 11, 2, 177-184
137. Ekici, Ö. D.; Li, Z. Z.; Campbell, A. J.; James, K. E.; Asgian, J. L.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Ganesan, R.; Jelakovic, S.; Grütter, M. G.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5728-5749
138. Sanner, T.; Pihl, A. *J. Biol. Chem.* **1963**, 238, 165-171
139. Evans, B.; Shaw, E. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 10227-10232

140. Willenbrock, F.; Brocklehurst, K. *Biochem. J.* **1985**, 227, 511-519
141. Willenbrock, F.; Brocklehurst, K. *Biochem. J.* **1984**, 222, 805-814
142. Gante, J. *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1780-1802
143. Kurtz, A.; Niemann, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 1879-1882
144. Magrath, J.; Abeles, R. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4279-4283
145. Graybill, T.; Ross, M.; Gauvin, B.; Gregory, J.; Harris, A.; Ator, M.; Rinker, J.; Dolle, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 1375-1380
146. Demuth, H.-U.; Baumgrass, R.; Schaper, C.; Fischer, G.; Barth, A. *J. Enzyme Inhib.* **1988**, 2, 129-142
147. Demuth, H.-U.; Neumann, U.; Barth, A. *J. Enzyme Inhib.* **1989**, 2, 239-248
148. Brömme, D.; Schierhorn, A.; Kirschke, H.; Wiederanders, B.; Barth, A.; Fittkau, S.; Demuth, H.-U. *Biochem. J.* **1989**, 263, 861-866
149. Smith, R.; Coles, P.; Spencer, R.; Copp, L.; Jones, C.; Krantz, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, 155, 1201-1206
150. Robinson, V.; Coles, P.; Smith, R.; Krantz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7760-7761
151. Broemme, D.; Demuth, H.-U. *Methods Enzymol.* **1994**, 244, 671-685
152. Verhelst, S. H. L.; Witte, M. D.; Arastu-Kapur, S.; Fonovic, M.; Bogoy M. *ChemBioChem* **2006**, 7, 943-950
153. Bucciarelli, M.; Forni, A.; Moretti, I.; Prati, F.; Torre, G. *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1* **1993**, 3041-3045
154. Renold, P.; Tamm, C. *Tetrahedron Asymmetry* **1993**, 4, 2295-2298
155. Korn, A.; Rudolph, S.; Moroder, L. *Tetrahedron* **1994**, 50, 1717-1730
156. Martichonok, V.; Plouffe, C.; Storer, A.; Menard, R.; Jones, J. B. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3078-3085
157. Kikuchi, H.; Yamada, T.; Furuya, H.; Doh-ura, K.; Ohyagi, Y.; Iwaki, T.; Kira, J. *Acta Neuropathol (Berl.)* **2003**, 105, 5, 462-468
158. Turk, D.; Turk, B.; Turk, V. *Biochem. Soc. Symp.* **2003**, 70, 15-30
159. Podgorski, I.; Sloane, B. F. *Biochem. Soc. Symp.* **2003**, 70, 263-276
160. Turk, D.; Guncar, G. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2003**, 59, (Pt 2), 203-213
161. Levicar, N.; Strojnik, T.; Kos, J.; Dewey, R. A.; Pilkington, G. J.; Lah, T. *T. J. Neurooncol.* **2002**, 58, 1, 21-32
162. Yan, S.; Sloane, B. F. *Biol. Chem.* **2003**, 384, 6, 845-854
163. Turk, V.; Turk, B.; Guncar, G.; Turk, D.; Kos, J. *Adv. Enzyme Regul.* **2002**, 42, 285-303
164. Leung-Toung, R.; Wodzinska, J.; Li, W.; Lowrie, J.; Kukreja, R.; Desilets, D.; Karimian, K.; Tam, T. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 24, 5529-5537
165. Karimian, K.; Tam, T. F.; Leung-Toung, R.; Li, W. US patent 6,162,791, **2000**
166. Travis, J.; Pike, R. N.; Imamura, T.; Potempa, J. *J. Peridont. Res.* **1997**, 32, 120-125
167. Kod C25: <http://merops.sanger.ac.uk>
168. Eichinger, A.; Beisel, H. G.; Jacob, U.; Huber, R.; Medrano, F. J.; et al. *EMBO J.* **1999**, 18, 5453-5462
169. Thornberry, N. A.; Lazebnik, Y. *Science*, **1998**, 281, 1312-6131
170. Uhlman, F.; Wernic, D.; Poupart, M.A.; Koonin, E..V.; Nasmyth, K.; *Cell*, **2000**, 103, 375-386

172. Manoury, B.; Hewitt, E. W.; Morrice, N.; Dando, P. M.; Barrett, A. J.; Watts, C. *Nature* **1998**, 396, 695-699
173. Aravind, L.; Koonin, E.V. *Proteins*, **2002**, 46, 355-367
174. Potempa, J.; Sroka, A.; Imamura, T.; Travis, J. *Current Protein and Peptide Science*, **2003**, 4 397-407
175. Potempa, J.; Pike, R.; Travis, J. *Biol. Chem.* **1997** 378, 223-230
176. Potempa, Banbula, A. R.; Travis, J. *Periodontol.* **2000**, 24, 153-192
177. Imamura, T.; Pike R. N.; Potempa, J.; Travis, J. *J. Clin. Invest.* **1994**, 94, 361-3676
178. Schenkein, H. A. *J. Peridont. Res.* **1988**, 187-192
179. Travis, J.; Pike, R. N.; Imamura, T.; Potempa, J. *J. Peridont. Res.* **1997**, 32, 120-125
180. Kadowaki, T.; Nakayama, K.; Yoshimura, F.; Okamoto, K.; Abe, N.; Ratnayake, D. B.; Yamamoto, K. *J. Biol Chem.*, **1998**, 273, 29072-29076.
181. Brochu, V.; Grenier, D.; Nakayama, K.; Maynard, D. *Oral Microbiol. Immunol.*, **2001**, 16, 79-87.
182. Scott, C. F.; Whitaker, E. J.; Hammond, B. F.; Colman, R. W. *J. Biol Chem.*, **1993**, 268, 7935-7942.
183. Sroka, A.; Szutkowska, M.; Potempa, J.; Travis, J.; Genco, C. A. *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 5609-5616
184. Lewis, J. P.; Dawson, J. A.; Hannis, J. C.; Muddiman, D.; Marcina, F. L. *J. Bacteriol.* **1999**, 181, 4905-4913
185. DeStefano, F.; Anda, R. F.; Kahn, H. S.; Williamson, D. F.; Russell, C. M. *Br. Med. J.* **1993**, 306, 688-691
186. Beck, J. D.; Pankow, J.; Tyroler, H. A.; Offenbacher, S. *Am. Heart J.* **1999**, 138, 528-533
187. Scannapieco, F. A.; *J. Periodontol.* **1999**, 70, 793-802
188. Teng, Y. T.; Taylor, G., W.; Scannapieco, F.; Kinane, D. F.; Curtis, M.; et al. *J. Can. Dent. Assoc.* **2002**, 68, 188-192
189. Romero, B. C.; Chiquito, C. S.; Elejalde, L. E.; Bernardoni, C. B. *J. Periodontol.* **2002**, 73, 1177-1183
190. Jeffcoat, M. K.; Hauth, J. C.; Geurs, N. C.; Reddy, M. S.; Cliver, S. P.; et al. *J. Periodontol.* **2003**, 74, 1214-1218
191. Kadowaki, T.; Yamamoto, K. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2003**, 4, 451-458
192. Gusman, H.; Travis, J.; Helmerhorst, E. J.; Potempa, J.; Troxler, R. F.; et al., *Infect. Immun.*, **2001**, 69, 1402-1408
193. Snipas, S. J.; Stennicke, H. R.; Riedl, S.; Potempa, J.; Travis, J.; et al. *Biochem. J.* **2001**, 357, 575-580
194. Kadowaki, T.; Kitano, S.; Baba, A.; Takii, R.; Hashimoto, M.; et al. *Biol. Chem.* **2003**, 384, 911-920
195. Imamura, T.; Matsushita, K.; Travis, J.; Potempa, J.; *Antimicrob. Agents Chem. other.* **2001**, 45, 2871-2876.
196. Bodet, Ch.; Piché, M.; Chandad, F.; Grenier, D. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, 57, 685-690
197. Potempa, J.; Pike, R.; Travis, J. *Biol. Chem.* **1997**, 378, 223-230
198. Mikolajczyk, J.; Boatright, K. M.; Stennicke, H. R.; Nazif, T.; Potempa, J.; Bogyo, M.; Salvesen G. S. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 12, 10458-10464
199. Kadowaki, T.; Baba, A.; Abe, N.; Takii, R.; Hashimoto, M.; et al. *Mol. Pharmacol.* **2004**, 66, 1599-1606

200. Curtis, M. A.; Aduse Opoku, J.; Rangarajan, M.; Gallagher, A.; Sterne, J. A.; et al. *Infect. Immun.* **2002**, 70, 6968-6975
201. Asgian, J. L.; James, K. E.; Li, Z. Z.; Carter, W.; Barrett, A. J.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4958-4960
202. Ekici, O. D.; Gotz, M. G.; James, K. E.; Li, Z. Z.; Rukamp, B. J.; et al. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1889-1892
203. Krauser, J. A.; Potempa, J.; Travis, J.; Powers, J.C. *Biol. Chem.* **2002**, 383, 1193-1198
204. Białas A.; Grembecka, J.; Krowarsch, D.; Otlewski, J.; Potempa, J.; Mucha, A. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 1744-1753
205. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1cvr>
206. a) *Ligand_Design 97 Molecular Modelling Program Package*; 97.0 ed.; Molecular Simulations Inc.: San Diego, CA b) *Insight 97 Molecular Modelling Program Package*; 97.0 ed.; Molecular Simulations Inc.: San Diego, CA
207. Steinmetzer, T.; Zhu, B. Y.; Konishi, Y. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3109-3115
208. Aplin, R. T.; Christiansen, J.; Young, G. T. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1983**, 21, 555-561
209. Neuberger, A.; Sanger, F. *Biochem.J.* **1943**, 37, 515
210. Albeck, A.; Persky, R. *Tetrahedron* **1994**, 50, 6333-6346
211. Abbenante, G.; March, D. R.; Bergman, D. A.; Hunt, P. A.; Garnham, B.; Dancer, R. J.; Martin, J. L.; Fairlie, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 10220-10226
212. Reeder, M. R.; Anderson, R. M. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 2828-2842
213. Tarhouni, R.; Kirschleger, B.; Rambaud, M.; Villieras, J. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 835
214. Chen, P.; Cheng, P. T. W.; Spergel, S. H.; Zahler, R.; Wang, X.; Thottathil, J.; Barrish, J.C.; Polniaszek, R. P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3175-3178
215. Reeder, M. R. WO 20025877, **2002**
216. Wang, D.; Schwinden, M. D.; Radesca, L.; Patel, B.; Kronenthal, D.; Huang, M-H.; Nugent, W. A. *J. Org. Chem.* **2004**, **69**, 1629-1633
217. Wittig, G.; Geissler G. *Liebigs Ann.* **1953**, 580, 44-57
218. Horner, L.; Hoffman, H. M. R.; Wippel, H. G. *Chem. Ber.* **1958**, 91 61-63
219. Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. *J. Org. Chem.* **1961**, 83, 1733-1738
220. Luly, J. R.; Dellaria, J. F.; Plattner, J. J.; Soderquist, J. L.; Yi, N. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 1487-1492
221. Hamada, Y.; Shioiri, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, 30, 1921
222. a) Mancuso, A. J.; Swern, D. *Synthesis*, **1981**, 165-185 b) Schmitz, W. D.; Messerschmidt, N. B.; Romo, D. *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 2058-2059
223. Fehrentz, J. A.; Castro, B. *Synthesis* **1983**, 676-678
224. Beck-Piotraschke, K.; Jakubke, H.-D. *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, 9, 9, 1505-1518
225. Albert E. Beguin, Cliff S. Hamilton *J. Am. Chem. Soc.* **1939**; 61, 2, 355-357
226. Wiesner, J.; Wißner, P.; Dahse, H.-M.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 785-792

227. Grison, C.; Gene`ve, S.; Halbin, E.; Coutrot, P. *Tetrahedron* 2001, 57, 4903–4923
228. Blanchette, M. A.; Choy, W.; Davis, J. T.; Essinfeld, A. P.; Massmune, S.; Roush, W. R.; Sakai, T. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 2183-2186
229. Logue, M. W. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 3455-3456
230. Misaki, T.; Nagese, R.; Matsumoto, K.; Tanabe, Y.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 2854-2855
231. Ronsheim, M. D.; Zercher, Ch. K.; *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 4535-4538
232. Dragojlovic, V. *Molecules* **2000**, 5, 674-698
233. Stork, G.; Danheiser, R. L. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 1775
234. Brownbridge, P. *Synthesis* **1983**, 1–28
235. Molander, G. A.; Eastwood, P. R. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 8382-8393
236. Walker, B.; Darkins, P. A.; McKervery, M. A.; Moncrieff, H. M.; Lynas, J. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 1481-1482
237. Darkins, P.; Groarke, M.; McKervery, M. A.; Moncrieff, H. M.; McCarthy, N.; Nieuvenhuyzen, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **2000**, 381-389
238. Hanessian, S.; Claridge, S.; Johnstone, S. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4261-4274
239. Adam, W.; Bialas, J.; Hadjiarapoglou, L. *Chem. Ber.* **1991**, 2377
240. Adam, W.; Chan, Y. Y.; Cremer, D.; Gauss, J.; Scheutzow, D.; Schindler, M. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 2800–2803
241. Sinisterra, J. V.; Fuentes, A.; Marinas, J. M. *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 3875-3879
242. Sinisterra, J. V.; Marinas, J. M.; Riquelme, F.; Arias, M. S. *Tetrahedron*, **1988**, 44, 5, 1431-1440
243. Albeck, A.; Persky, R. *Tetrahedron*, **1994**, 50, 6333-6346
244. Albeck, A.; Estreicher, G. I. *Tetrahedron*, **1997**, 53, 14, 5325-5338
245. Spaltenstein, A.; Leban, J. J.; Huang, J. J.; Reinhardt, K. R.; Viveros, O. H.; Sigafos, J.; Crouch, R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 9, 1343-1346
246. Asensio, G.; Mello, R.; Boix-Bernardini, C.; Gonzalez-Ndiiez, M. E.; Castellanot, G. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 12, 3692-2699
247. Baumstark, A. L.; Mc Closkey, C. J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3311
248. Baumstark, A. L.; Vasquez, P. C. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 3437
249. Chen, Z.; Potempa, J.; Polanowski, A.; Wikstrom, M.; Travis, J. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 18896-18901
250. Romeo, S.; Rich, D. H. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 45, 7187-7190
251. Meth-Cohn, O.; Moore, C.; Taljaard, H. C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1988**, 2663-2674
252. Wakefield, B. J. *The chemistry of Organolithium Compounds*, Pergamon Press, Oxford, **1974**
253. Nakamura, R.; Tanino, K.; Miyashita, M. *Org. Lett.* **2003**, 5, 20 3583-3586
254. Białas, A. *Chlorometyloketony, pochodne lizyny, jako niskocząsteczkowe inhibitory gingipainy K*, praca magisterska, Wrocław 2002
255. Allen, N. E.; Boyd, D. B.; Campbell, J. B.; Deeter, J. B.; Elzey, T. K.; Foster, J. B.; Hartfield, L. D.; et al. *Tetrahedron*, **1989**, 45, 7, 1905-1928
256. Midura-Nowaczek, K. *J. Prakt. Chem.* **1996**, 338, 380-382