

Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii
Politechnika Wrocławska

Łukasz Berlicki

Projektowanie i synteza inhibitorów syntetazy glutaminy

Praca wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. inż. Pawła Kafarskiego

Wrocław 2004

Podziękowania

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy i wspierali mnie przez okres jej wykonywania. W szczególności dziękuję:

- prof. Pawłowi Kafarskiemu za zaproponowanie tematu pracy i zawsze życzliwą pomoc;
- dr Arturowi Musze za cenne dyskusje i krytyczne uwagi na temat manuskryptu niniejszej pracy;
- wszystkim członkom zespołu Chemii Bioorganicznej za dobrą atmosferę w laboratorium;
- Mojej Żonie i wszystkim bliskim mi Osobom za troskę i wsparcie.

Dziękuję także Komitetowi Badań Naukowych za finansowanie przedstawionej pracy grantem promotorskim nr 3 PO4B 01022, a także Wrocławskiemu Centrum Sieciowo-Superkomputerowemu za grant obliczeniowy, który umożliwił obliczenia z wykorzystaniem jego oprogramowania i sprzętu.

Spis treści

1. Wstęp — syntetaza glutaminy.....	7
1.1. Sekwencja aminokwasowa.....	7
1.2. Struktura enzymu.....	10
1.2.1. Struktury krystaliczne.....	11
1.2.2. Struktura enzymu bakteryjnego.....	12
1.2.3. Struktura enzymów z eukariota.....	15
1.3. Mechanizm reakcji enzymatycznej.....	15
1.4. Reaktywność syntetazy glutaminy.....	18
1.4.1. Specyficzność substratowa.....	18
1.4.2. Reakcje katalizowane przez GS.....	20
1.5. Regulacja aktywności enzymu.....	21
1.5.1. Klasyczny mechanizm regulacji GS.....	21
1.5.2. Regulacja aktywności GS w cyjanobakteriach.....	24
1.6. Inhibitory syntetazy glutaminy.....	25
1.6.1. Sulfoksyimina metioniny i jej analogi.....	25
1.6.2. Fosfinotricyna i jej analogi.....	27
1.6.3. Inne analogi kwasu glutaminowego.....	30
1.6.4. Bisfosfoniany.....	31
1.7. Zastosowanie inhibitorów syntetazy glutaminy.....	34
1.7.1. Herbicydy.....	34
1.7.2. Leki przeciwgruźlicze.....	36
2. Cel pracy.....	38
3. Wyniki i dyskusja.....	39
3.1. Analiza sposobu działania herbicydowo aktywnych bisfosfonianów.....	40
3.2. Analiza aktywności inhibitorowej względem GS bisfosfonianów metodami 3-D QSAR.....	47
3.3. Analiza oddziaływań fosfinotricyny i jej analogów z syntetazą glutaminy.....	50
3.3.1. Analiza sposobu działania fosfinotricyny i sulfoksyiminy metioniny.....	50
3.3.2. Analiza zależności wyniku funkcji oceniającej od stałej inhibicji dla wybranych inhibitorów.....	56
3.3.3. Analiza struktury elektronowej wybranych analogów fosfinotricyny.....	58
3.4. Projektowanie analogów fosfinotricyny.....	62

3.5. Synteza pochodnych fosfinotricyny.....	71
3.5.1. Analiza retrosyntetyczna.....	71
3.5.2. Synteza pochodnych kwasu α -amino- γ -jodomasłowego.....	72
3.5.3. Synteza kwasów H-fosfinowych.....	75
3.5.4. Sprzęganie kwasów H-fosfinowych z pochodną kwasu α -amino- γ - jodomasłowego.....	81
3.5.5. Utlenianie kwasów H-fosfinowych.....	86
3.6. Projektowanie analogów kwasu 4- <i>N</i> -hydroksy-2,4-diaminomasłowego.....	89
3.7. Synteza analogów kwasu 4- <i>N</i> -hydroksy-2,4-diaminomasłowego.....	98
3.8. Aktywność enzymatyczna <i>in vitro</i> otrzymanych związków.....	106
4. Podsumowanie.....	108
5. Lista publikacji.....	111
6. Metody obliczeniowe i eksperyment.....	112
6.1. Metody obliczeniowe.....	112
6.1.1. Analiza sposobu działania herbicydowo aktywnych bisfosfonianów.....	112
6.1.2. Przewidywanie aktywności inhibitorowej.....	113
6.1.3. Zastosowanie metod 3-D QSAR / CoMFA.....	113
6.1.4. Analiza oddziaływań analogów fosfinotricyny z syntetazą glutaminy.....	113
6.1.5. Projektowanie nowych, potencjalnych inhibitorów syntetazy glutaminy....	114
6.2. Eksperyment.....	117
6.2.1. Odczynniki.....	117
6.2.2. Analiza.....	117
6.2.3. Preparatyka.....	118
6.2.3.1. Synteza analogów fosfinotricyny.....	118
6.2.3.2. Utlenianie kwasów H-fosfinowych.....	128
6.2.3.3. Synteza analogów kwasu 4- <i>N</i> -hydroksy-2,4-diaminomasłowego.....	129
7. Literatura.....	138

Spis używanych skrótów:

3D-QSAR/CoMFA — ilościowa zależność pomiędzy funkcją a strukturą, analiza porównawczego pola molekularnego, (*Quantitive Structure Activity Relationship / Comparative Molecular Field Analysis*);

Ac — acetyl;

ADP — adenozyndifosforan;

AMP — adenozymonofosforan;

AMPPNP — fosforamidowy analog ATP;

AT — adenylotransferaza;

ATP — adenozynt trifosforan;

Bzl — benzyl;

CTP — cytozynt trifosforan;

DAHP — 3-deoksy-D-arabino-heptulozo-7-fosforan;

DMAP — *N,N*-dimetyloaminopirydyna;

DMF — *N,N*-dimetyloformamid;

DMSO — sulfotlenek dimetylu;

ESI-MS — spektrometria masowa z jonizacją typu elektrosprej;

Et — etyl;

Fmoc — fluorenometyloksykarbonyl;

FPP — pirofosforan farnezyli;

GPP — pirofosforan geranyli;

GS — syntetaza glutaminy;

HMDS — heksametylodisilazan;

i-Bu — izobutyl;

i-Pr — izopropyl;

Me — metyl;

MetSox — sulfoksymina metioniny;

NMM — *N*-metylomorfolina;

NMR — spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego;

PAT — transferaza acetylofosfinotricyny;

PDB — baza danych struktur białkowych (ang. *Protein Data Bank*);

PEP — kwas fosfoenolopirogronowy;

Ph — fenyl;

PPT — fosfinotricyna;

p-TSA — kwas *p*-toluenosulfonowy;

t-Bu — *tert*-butyl;

THF — tetrahydrofuran;

TMS — trimetylosilyl;

Tos — *p*-toluenosulfonyl;

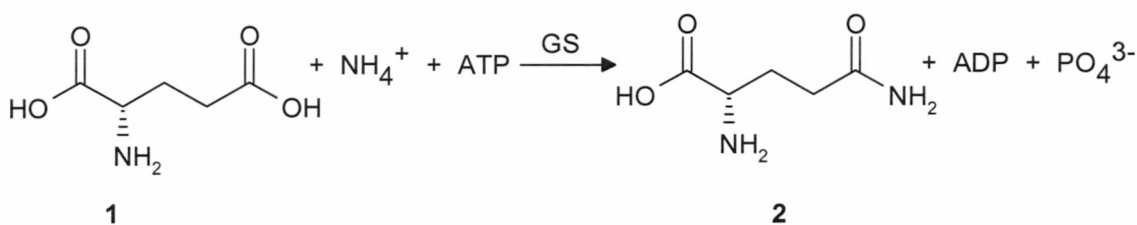
Z — benzyloksykarbonyl;

UTP — urydylotrifosforan.

1. Wstęp — syntetaza glutaminy

Glutamina jest jednym z najciekawszych metabolitów w organizmach żywych. Stanowi jeden z podstawowych aminokwasów budujących białka, jest donorem amidowego atomu azotu w wielu reakcjach biochemicznych, nośnikiem bardzo toksycznego amoniaku, pełni także ważną rolę w przekazywaniu sygnałów i odżywianiu neuronów [1]. Istotna rola glutaminy w metabolizmie organizmów żywych powoduje, że enzym ją syntezujący — syntetaza glutaminy (GS) znajduje się w centrum szlaków biochemicznych [1-5]. Enzym ten jest ściśle powiązany z wieloma procesami w organizmie a poziom jego aktywności jest regulowany na wiele sposobów w zależności od równowagi związków azotu.

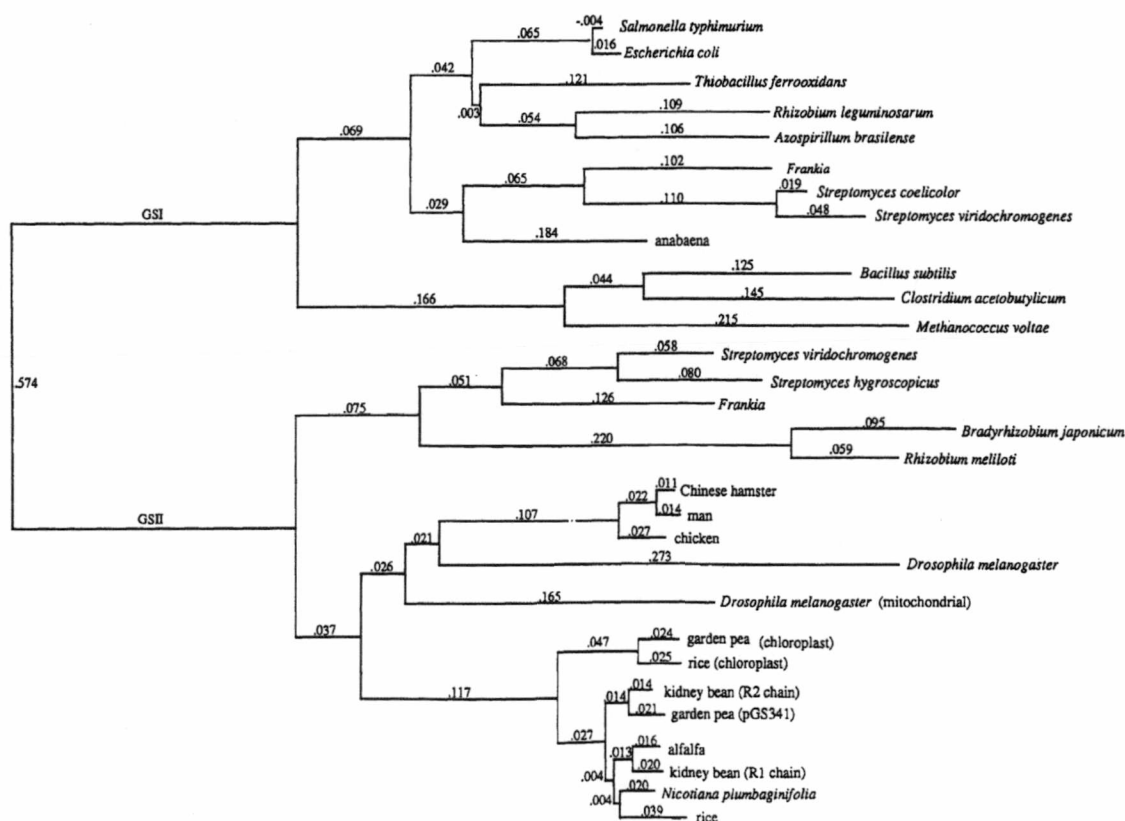
Pierwsze doniesienie na temat syntezy glutaminy z glutaminianu i jonu amonowego opublikował Krebs już w roku 1935, na podstawie badania wycinków z nerek świni i królika [6]. Zauważył on także, że synteza glutaminy jest silnie związana z procesem oddychania tkanki, co pośrednio wskazywało na udział ATP. Późniejsze badania Specka wykazały, że do przebiegu tej reakcji niezbędne są poza kwasem glutaminowym i jonami amonowymi, ATP i jony magnezu [7]. Ostatecznie stechiometria reakcji została ustalona w roku 1951 (Schemat 1.1) [8].



Schemat 1.1.

1.1. Sekwencja aminokwasowa

Wszystkie organizmy żywe posiadają dobrze funkcjonującą syntetazę glutaminy. Rozróżniane są dwa typy tego enzymu: GSI i GSII. GSI znaleziono wyłącznie w organizmach prokariotycznych. GSII funkcjonuje we wszystkich organizmach eukariotycznych, ale można go też znaleźć u niektórych prokariota. Porównywanie sekwencji aminokwasów z wielu organizmów wykazało, że GSI i GSII wywodzą się z jednego genu.



Rysunek 1.1.

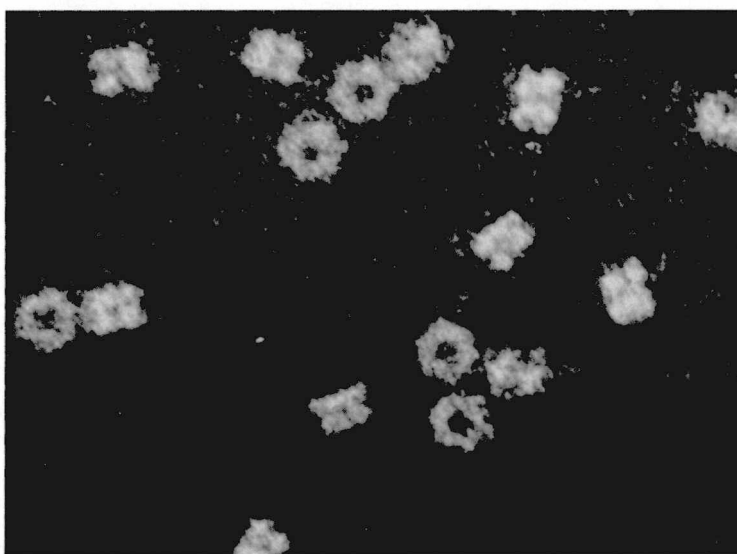
Drzewo ewolucji genów syntetazy glutaminy [9].

Drzewo ewolucji genu syntetazy glutaminy (Rysunek 1.1) jest wynikiem porównania 30 sekwencji aminokwasowych tego enzymu z różnych organizmów [9]. W prosty sposób można rozróżnić dwie duże, podstawowe gałęzie, które odpowiadają dwóm wyróżnionym typom enzymu [10-12]. Gałąź GSI zawiera jedynie sekwencje enzymów z prokariota. Natomiast w gałęzi GSII znajdują się wszystkie enzymy z eukariota, oraz GSII występujące u prokariota. W gałęzi enzymów z eukariota można wyróżnić podgałęzie: enzymy roślinne i zwierzęce. Występowanie GSII u prokariota tłumaczy się poprzez możliwość wstecznego przeniesienia enzymu GSII z organizmów eukariotycznych. Jednakże najważniejszym wnioskiem, który można wyciągnąć analizując przedstawione drzewo ewolucji genów GS jest to, że GSI i GSII pochodzą od wspólnego przodka. Według przybliżonych obliczeń rozdział pomiędzy genami obu typów enzymów nastąpił najprawdopodobniej wcześniej niż miliard lat temu [9, 13]. Datując powstanie życia na Ziemi na ok. 4 miliardy lat temu, można przypuszczać, że gen syntetazy glutaminy jest jednym z najstarszych funkcjonujących genów.

Rysunek 1.2 przedstawia porównanie sekwencji aminokwasowej [14] dla organizmów: *Escherichia coli* [15], *Mycobacterium tuberculosis* [16], *Salmonella typhimurium* [17], soja [18], groszek ogrodowy [19], szczur [20] i człowiek [21]. Czerwonymi kropkami zaznaczono pozycje reszt aminokwasowych, które budują centrum aktywne enzymu bakteryjnego. Pomimo niskiej homologii sekwencyjnej enzymów typu GSI i GSII wszystkie reszty centrum aktywnego są zachowane w enzymach z różnorodnych organizmów, co wskazuje, że budowa ich wnęki katalitycznej jest podobna.

1.2. Struktura enzymu

Syntetaza glutaminy ma bardzo skomplikowaną strukturę. Pomimo wieloletnich badań, dobrze poznana jest jedynie struktura enzymu pochodzącego z bakterii. Natomiast o strukturze syntetazy glutaminy z organizmów eukariotycznych wiadomo niewiele ponad to, że znacznie różni się od struktury enzymu bakteryjnego. Podstawowym narzędziem w badaniu trójwymiarowej struktury białek jest rentgenografia strukturalna. Jednak w przypadku syntetazy glutaminy pierwsze informacje strukturalne otrzymano przy pomocy mikroskopu elektronowego już w roku 1968 (Rysunek 1.3) [22, 23]. Dla dokładniejszego poznania struktury enzymu konieczne jednak było rozwiązanie jego struktury krystalicznej.



Rysunek 1.3.

Zdjęcie cząsteczek syntetazy glutaminy z *E. Coli* wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego [24].

1.2.1. Struktury krystaliczne

Ze względu na bardzo dużą masę cząsteczkową (ok. 600 000Da) długo nie była znana struktura krystaliczna syntetazy glutaminy. Dodatkowa trudność wynikała z możliwości adenylacji enzymu, co wprowadzało nieuporządkowanie do kryształów. Pierwszą strukturę krystaliczną opublikowano w roku 1986 (Tabela 1.1) [25]. W tym czasie była to jedna z największych i najbardziej skomplikowanych rozwiązanych struktur krystalicznych.

Tabela 1.1.

Zestawienie struktur krystalicznych syntetazy glutaminy zdeponowanych w PDB.

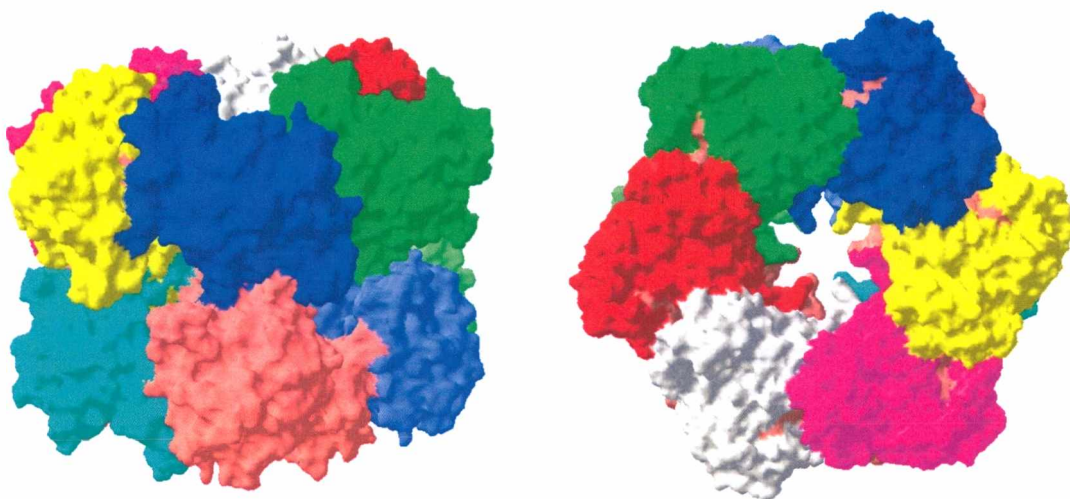
Kod w PDB	Data publikacji w PDB	Organizm	Rozdzielczość [Å]	Zawiera	Lit.
1HTO	1.01.2001	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.40	12 podjednostek, AMP	[26]
1FPY	31.08.2000	<i>Salmonella typhimurium</i>	2.49	12 podjednostek, ADP, fosfinotricyna	[27, 28]
1F52	12.06.2000	<i>Salmonella typhimurium</i>	2.49	12 podjednostek, ADP	[27, 28]
1F1H	19.05.2000	<i>Salmonella typhimurium</i>	2.67	12 podjednostek, ADP, Tl^+	[27, 28]
1LGR	05.08.1994	<i>Salmonella typhimurium</i>	2.80	1 jednostka (reszty 1-57, 64-324, 329-393, 407-468), AMP,	[29]
2LGS	05.08.1994	<i>Salmonella typhimurium</i>	2.80	1 jednostka (reszty 1-57, 64-324, 329-393, 407-468), AMP, glutaminian	[30]
2GLS	19.05.1989	<i>Salmonella typhimurium</i>	3.50	12 podjednostek	[25, 31]

W celu otrzymania kryształów użyto enzymu nieadenylowanego. Został on wyizolowany z mutantu *Salmonella typhimurium*, który nie ma rozwiniętego systemu adenylacji tego białka. Strukturę tę udokładniono do rozdzielczości 3.5Å w roku 1989 [31], a późniejsze pomiary pozwoliły otrzymać struktury o rozdzielczości 2.8Å [29, 31-33]. Jednakże struktury te nie opisywały w pełni enzymu. Brak danych o niektórych resztach aminokwasowych wynikał z labilności tych części enzymu, co powodowało nieuporządkowanie w kryształach i uniemożliwiało wyznaczenie ich położenia. W roku 2001 opublikowano pełną strukturę syntetazy glutaminy o rozdzielczości 2.49Å ze związaną fosfinotricyną — jednym z najsilniejszych jej inhibitorów [27]. Ze względu na zainteresowanie możliwością walki z gruźlicą za pomocą inhibitorów syntetazy glutaminy, wyznaczono strukturę enzymu z *Mycobacterium tuberculosis* — bakterii będącej patogenem tej choroby [26, 28].

1.2.2. Struktura enzymu bakteryjnego

Syntetaza glutaminy jest wyjątkowo dużym enzymem. Masa cząsteczkowa białka wyizolowanego z *Salmonella typhimurium* wynosi 620kDa natomiast z *Mycobacterium tuberculosis* 640kDa. Enzym bakteryjny składa się z dwunastu identycznych podjednostek ułożonych w dwa połączone sześciokąty (Rysunek 1.4). Taka struktura ma symetrię typu 622, czyli posiada jedną oś sześciokrotną i trzy osie dwukrotne. Szerokość enzymu wzdłuż osi dwukrotnej wynosi 140Å a wzdłuż osi sześciokrotnej 100Å [14].

Stabilność tak wielkiej struktury jest utrzymywana dzięki licznym oddziaływaniom hydrofobowym i wiązaniom wodorowym pomiędzy jednostkami [25]. *N*-Koniec i *C*-koniec każdej podjednostki przyjmuje konformację helikalną. *C*-Końcowa helisa tworzy strukturę podobną do rogu (widoczna na Rysunku 1.5 w dolnej części cząsteczki), która lokuje się w hydrofobowej wnęce podjednostki z sąsiedniego sześciokąta. Co więcej, w centralnym tunelu dodekameru jest utworzonych sześć struktur typu beta, z których każda składa się z dwóch łańcuchów jednostek leżących naprzeciw siebie w sześciokątach.

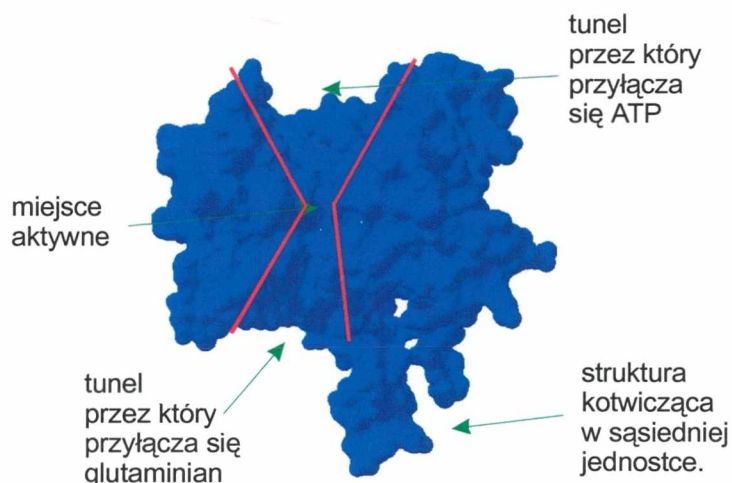


Rysunek 1.4.

Struktura syntetazy glutaminy (kod w PDB – 1F52).

Struktura syntetazy glutaminy ekspozuje do roztworu kilka pętli, które uczestniczą w regulacji aktywności enzymu. Najważniejszą jest pętla adenylacyjna zawierająca tyrozynę 397, która może ulegać kowalencyjnej modyfikacji poprzez reakcję z ATP.

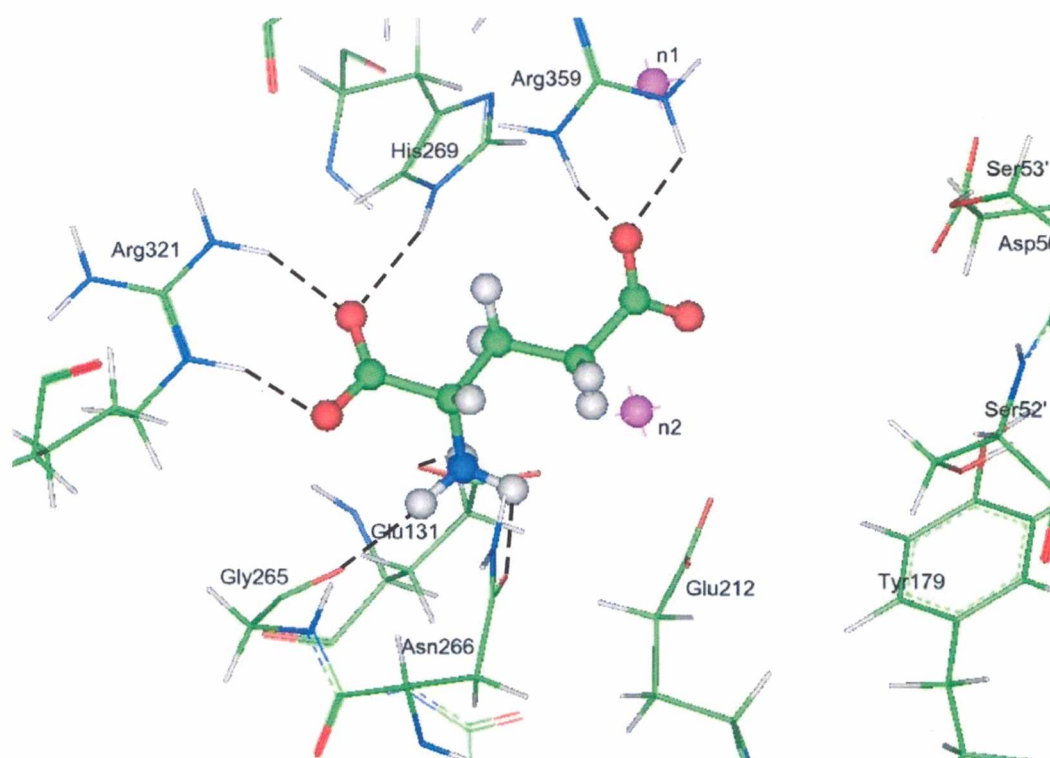
W każdej cząsteczce enzymu znajduje się dwanaście miejsc aktywnych, każde położone na styku dwóch podjednostek. Miejsce aktywne ma kształt dwóch połączonych stożków (Rysunek 1.5). Z jednej strony przylacza się cząsteczka ATP, z drugiej glutaminian. Średnica stożków wynosi ok. 30 Å na zewnątrz i ok. 15 Å w miejscu ich połączenia, całość ma długość ok. 45 Å.



Rysunek 1.5.

Pojedyncza podjednostka syntetazy glutaminy.

W miejscu złączenia się stożków znajdują się dwa jony metalu — może to być zarówno mangan jak i magnez na drugim stopniu utlenienia. Pełnią one ważną rolę zarówno w stabilizacji struktury miejsca aktywnego, w wiązaniu substratów, jak i przebiegu reakcji enzymatycznej. Przez tunel otwierający się ku górze (wg Rysunku 1.5) do miejsca aktywnego przyłącza się ATP. Natomiast glutaminian i jon amonowy wchodzi poprzez stożek otwierający się w dół. γ -Fosforanowa grupa ATP silnie oddziałuje z jonami metali znajdującymi się w centrum aktywnym (szczególnie z jonem n2), co znacznie stabilizuje wiązanie tego substratu. Dodatkowo, jony n1 i n2 wspomagają reakcję przeniesienia grupy fosforanowej na γ -karboksylową grupę glutaminianu. Glutaminian jest ściśle dopasowany do miejsca aktywnego (Rysunek 1.6). Jeden z atomów tlenu grupy γ -karboksylowej silnie oddziałuje z jonem n1, natomiast drugi jest związany przez dwa wiązania wodorowe z resztą argininy 359. Grupa α -karboksylowa tworzy dwa wiązania wodorowe z resztą argininy 321, a dodatkowo naładowana grupa α -aminowa tworzy wiązania z Glu131 i Gly265. Obok grupy γ -karboksylowej glutaminianu znajduje się miejsce wiązania jonu amonowego. Jest to ujemnie naładowana wnęka tworzona przez reszty: Asp50', Ser53', Tyr179, Glu212, która zamyka się podczas reakcji za pomocą pętli zawierającej Glu327.



Rysunek 1.6.

Struktura miejsca aktywnego syntetazy glutaminy (kod w PDB 1LGS).

W centrum aktywnym enzymu znajdują się dwa dwudodatnie jony metalu, którymi w natywnych enzymach są mangan albo magnez. Pomiary wykazały, że enzym nie traci swojej aktywności, gdy jony te zostaną wymienione na jony kobaltu, żelaza czy też chromu [34-39]. Jednakże optymalne pH dla reakcji enzymatycznej zależy od rodzaju jonu oraz jego stężenia. Po całkowitym usunięciu jonów metalu z enzymu zmienia on konformację — pojawiają się nowe reszty aminokwasowe ekspozowane do rozpuszczalnika, a ogólna geometria jest zniekształcona (co objawia się zmianą współczynnika sedymentacji i lepkości roztworu) [40]. Proces przyłączania/odłączania jonów metalu jest odwracalny. Można wyróżnić różne stałe wiązania dla pierwszych 12 jonów (jeden jon na podjednostkę dodekameru) i dla kolejnych 12 [41].

1.2.3. Struktura enzymu z eukariota

Struktura syntetazy glutaminy z organizmów eukariotycznych znacznie różni się od tej z prokariota. Porównanie sekwencji wykazuje, że homologia pomiędzy tymi dwoma grupami enzymów jest niewielka. Enzym z prokariota jest nazywany GSI a z eukariota GSII. Znana jest struktura krystaliczna tylko enzymów bakteryjnych, jednakże wszystkie reszty aminokwasowe tworzące miejsce aktywne w tych enzymach są niezmiennicze we wszystkich zsekwencjonowanych enzymach. Wskazuje to na znaczną konserwatywność w budowie miejsca aktywnego także w enzymach eukariotycznych [9]. Cząsteczka GSII składa się z ośmiu identycznych podjednostek, z których każda zawiera około 372 reszty aminokwasowe [42].

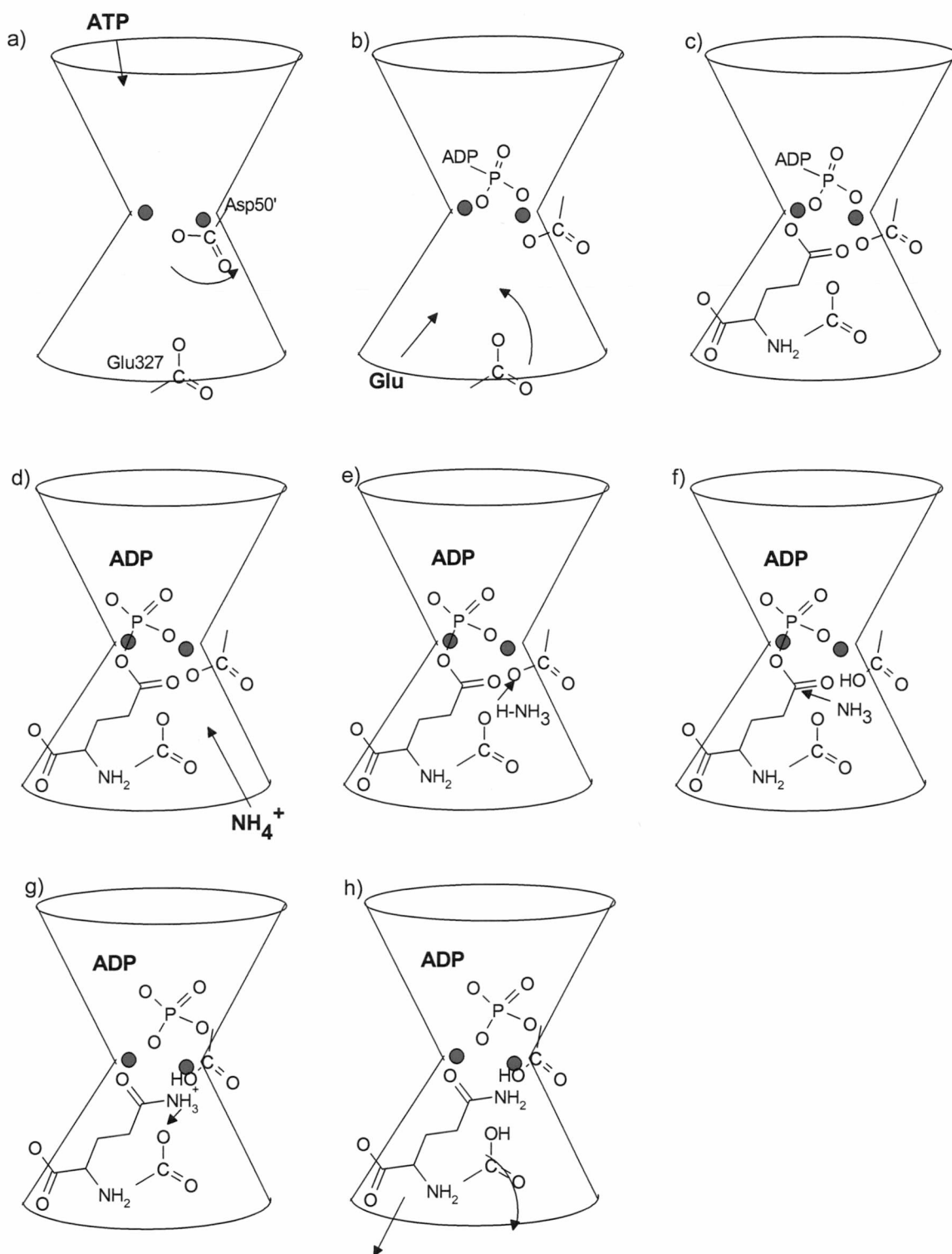
Badania nad GSII skupiają się głównie na enzymach z mózgów różnych organizmów. Wiadomo, że syntetaza glutaminy odgrywa ważną rolę w rozwoju wielu chorób. Są to: schizofrenia, choroba Parkinsona [43], choroba Alzheimera [44] oraz choroba Huntingtona [45]. Dodatkowo, zwiększony poziom syntetazy glutaminy jest obserwowany podczas urazów mózgu [46].

1.3. Mechanizm reakcji enzymatycznej

Mechanizm biosyntezy glutaminy jest dosyć skomplikowanym procesem, który składa się z dwóch reakcji chemicznych. W pierwszym etapie glutaminian jest fosforylowany przy udziale ATP, następnie powstały mieszaniny bezwodnik — γ -

glutamylofosforan — reaguje z jonem amonowym dając glutaminę i wolny fosforan [46]. Szczegółowy mechanizm reakcji poznano dzięki otrzymaniu serii struktur krystalicznych syntetazy glutaminy ze skompleksowanymi: a) glutaminianem, b) analogiem strukturalnym ATP — AMPPNP, c) sulfoksyiminą L-metioniny — analogiem stanu przejściowego reakcji, d) glutaminą, e) ADP [32]. Dzięki temu, że struktury wyznaczono dla kompleksów z substratami, analogiem stanu przejściowego i produktami, otrzymano obrazy reakcji enzymatycznej pokazane tak, jak na kolejnych klatkach filmu [14]. W kolejnych etapach reakcji reszty aminokwasowe budujące centrum aktywne zmieniają swoje położenie tak, aby wiązanie cząsteczek było optymalne.

Kolejne fazy reakcji enzymatycznej przedstawia Rysunek 1.7. W pierwszym kroku przyłączana jest cząsteczka ATP (Rysunek 1.7a), w wyniku czego reszty aminokwasowe Arg359 i Asp50' przesuwają się tak, aby zwiększyć siłę wiązania odpowiednio glutaminianu i jonu amonowego. Natomiast jony metalu związane w enzymie polaryzują γ -fosforanową grupę ATP tak, aby była bardziej podatna na atak grupy γ -karboksylowej glutaminianu. W następnym etapie w centrum aktywnym lokuje się glutaminian (Rysunek 1.7b). Dzięki silnemu oddziaływaniu jego grupy γ -karboksylowej z jonem metalu n1, możliwe jest jej ułożenie w pobliżu γ -fosforanowej grupy ATP. Pętla z resztą Glu327 zamyka się stabilizując cały układ. W konsekwencji glutaminian reaguje z ATP dając γ -glutamylofosforan i ADP (Rysunek 1.7c). W kolejnym kroku jon amonowy przyłącza się do negatywnie naładowanej wnęki tworzonej przez reszty: Glu327, Asp50', Tyr179, Glu212 (Rysunek 1.7d). Zostaje on następnie zdeprotonowany przez resztę kwasu asparaginowego Asp50' (Rysunek 1.7e), a powstały amoniak reaguje z aktywną formą glutaminianu uwalniając fosforan (Rysunek 1.7f). Stan przejściowy reakcji jest stabilizowany przez grupę γ -karboksylową reszty Glu327, która tworzy mostek solny z dodatnio naładowaną grupą amidową glutaminy (Rysunek 1.7g). Ostatecznie proton z grupy amidowej jest przenoszony na grupę γ -karboksylową reszty Glu327 i powstaje glutamina. Po tej reakcji, pętla z resztą Glu327 słabiej oddziałuje z produktem i możliwe staje się jej odchylenie. Ten ruch pozwala uwolnić glutaminę z miejsca aktywnego i przyjąć nową cząsteczkę substratu (Rysunek 1.7h).



Rysunek 1.7.

Mechanizm reakcji enzymatycznej w bakteryjnej syntetazie glutaminy.

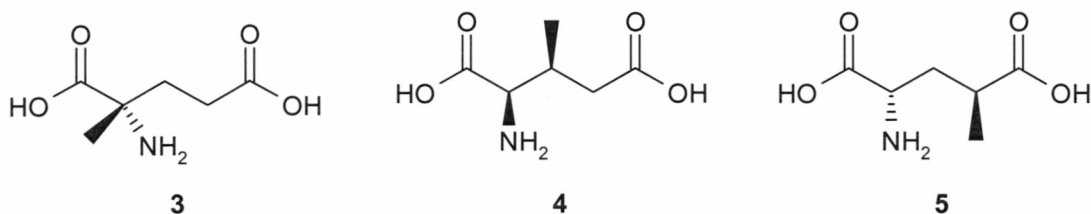
1.4. Reaktywność syntetazy glutaminy

1.4.1. Specyficzność substratowa

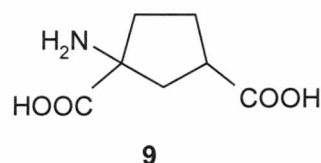
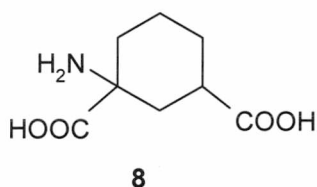
Specyficzność substratowa syntetazy glutaminy była intensywnie badana z uwzględnieniem każdego z trzech związków (glutaminian, NH_4^+ i ATP) biorących udział w reakcji enzymatycznej. Badania te były najszerzej rozwijane w początkowym okresie studiów nad GS, kiedy nieznane były struktury krystaliczne enzymu, a dane o reaktywności różnego rodzaju pochodnych substratów dawały możliwość lepszego poznania miejsca aktywnego enzymu.

Syntetaza glutaminy potrafi przyłączyć do kwasu glutaminowego szereg różnych analogów amoniaku. Są to jego proste pochodne takie jak: hydrazyna [7], metylohydrazyna [47] i hydroksyloamina [48]. W reakcji z udziałem metylohydrazyny powstaje tylko jeden z możliwych izomerów — 2-metylohydrazyd kwasu glutaminowego, co dowodzi wiązania metylohydrazyny w miejscu aktywnym w specyficzny sposób*. Wykazano także, że powstawanie drugiego produktu — 1-metylohydrazydu — jest wynikiem reakcji nieenzymatycznej obserwowanej w przypadku użycia nadmiaru substratu [49]. Reaktywność hydroksyloaminy w reakcji enzymatycznej jest obecnie szeroko wykorzystywana podczas pomiarów aktywności inhibitorów GS, ponieważ kwas hydroksamowy powstający w tej reakcji tworzy kompleksy z żelazem (III) o silnym zabarwieniu, łatwe do identyfikacji metodą UV-Vis.

Przebadano także szereg analogów kwasu L-glutaminowego. Już pierwsze badania wykazały, że syntetaza glutaminy nie jest wysoce stereospecyficzna i katalizuje także reakcję kwasu D-glutaminowego [37, 50, 51]. Jednakże w przypadku bardziej zatłoczonego kwasu α -metyloglutaminowego reaguje już wyłącznie izomer L (związek 3) [50-52].



* Badania nad reaktywnością hydrazyny i jej pochodnych w reakcji katalizowanej przez GS prowadzono ze względu na możliwe zastosowanie tego enzymu do usuwania skażeń hydrazyną, która była używana jako materiał napędowy w rakietach.

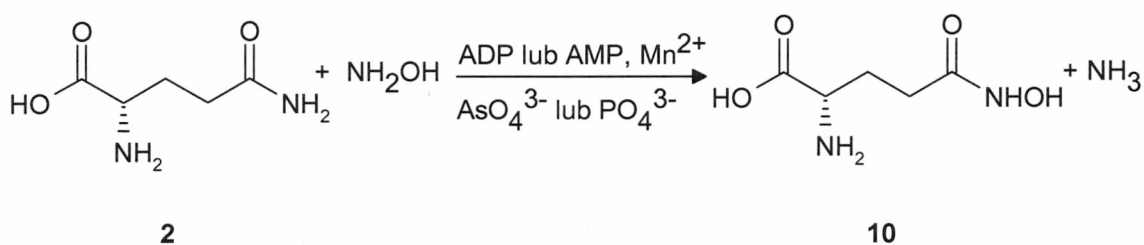


Badania nad związkiem **8** wniosły także pewien wkład w udowodnienie mechanizmu reakcji enzymatycznej. Próby wydzielenia γ -glutamylofosforanu nie powiodły się, ponieważ cyklizuje on natychmiast po uwolnieniu go z enzymu do roztworu. Możliwe jest więc obserwowanie tylko produktu cyklizacji będącego tylko pośrednim dowodem na istnienie stanu przejściowego reakcji enzymatycznej w postaci γ -glutamylofosforanu. W porównaniu do γ -glutamylofosforanu, ufosforylowana forma związku **8** ma znacznie mniejszą aktywność i nie może cyklizować. Dzięki temu udało się wyizolować produkt pośredni — ufosforylowany związek **8** i bezpośrednio potwierdzić proponowany mechanizm reakcji enzymatycznej [62].

Badania nad różnymi pochodnymi ATP wykazały, że podstawienie w pozycjach 6 lub 8 pierścienia purynowego nie wpływa na przebieg reakcji enzymatycznej. Przebadane pochodne: 8-bromo-ATP, 8-merkapt-ATP, 8-[(aminoetylo)-amino]-ATP oraz 6-merkapt-ATP były substratami dla syntetazy glutaminy [63]. Co więcej, związane do enzymu merkapt-pochodne można było dalej modyfikować. Badania te nie miały jednak na celu strukturalnego badania wnętrza aktywnej enzymu, ponieważ znane już były pierwsze wyniki pomiarów rentgenograficznych opisujących strukturę krystaliczną enzymu [25]. Ich istotą było proste wprowadzenie pochodnych chromogenicznych lub fluorescencyjnych do struktury enzymu bez jego kowalencyjnej modyfikacji. Takie ‘próbki’ dawały możliwość badania enzymu różnymi technikami [64].

1.4.2. Reakcje katalizowane przez GS

Syntetaza glutaminy w organizmie żywym katalizuje reakcję biosyntezy L-glutaminy z kwasu L-glutaminowego i jonu amonowego przy udziale ATP. Ta reakcja jest nazywana biosyntetyczną. Na podstawie doświadczeń *in vitro* wykazano, że enzym ten może także katalizować inne reakcje. Jedną z tych reakcji jest synteza kwasu γ -glutamylohydroksamowego (**10**) z L-glutaminy (Schemat 1.2).



Schemat 1.2.

Reakcja ta katalizowana jest przez ADP lub AMP oraz jony manganu (II) lub kadmu (II) [65]. Podobnie jak reakcja biosyntetyczna zachodzi ona poprzez produkt przejściowy, którym może być γ -glutamylofosforan (jeżeli w roztworze obecne są jony fosforanowe) lub γ -glutamyloarsenian (dla reakcji z udziałem jonów arsenowych). Jest to reakcja określana w literaturze transferową.

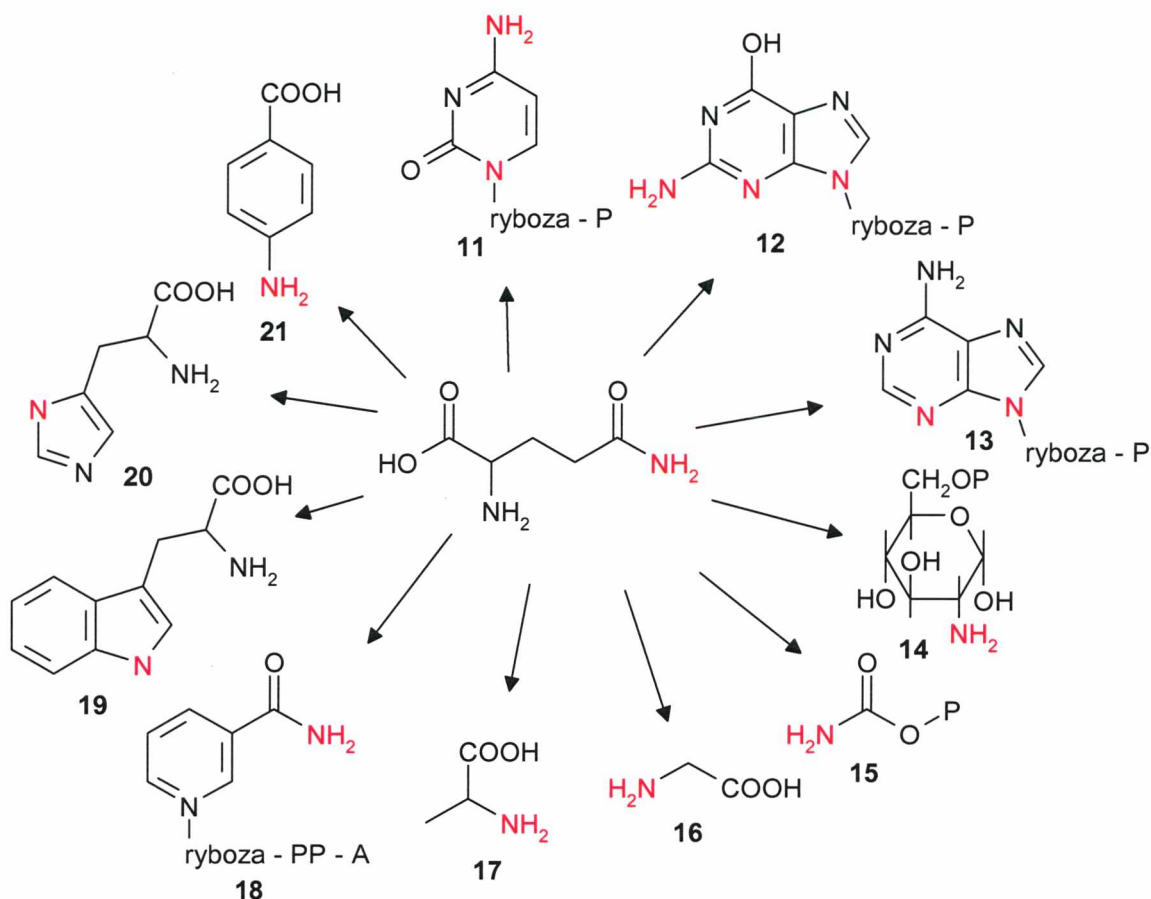
Syntetaza glutaminy może także katalizować reakcję hydrolizy L-glutaminy do kwasu glutaminowego. Reakcja ta może mieć trzy warianty. Po pierwsze, gdy w reakcji bierze udział ADP i fosforan powstaje ATP — jest to reakcja odwrotna do reakcji biosyntetycznej. Po drugie, w obecności AMP i fosforanu może powstawać pirofosforan [66]. Po trzecie, reakcja hydrolizy może przebiegać z udziałem jonu arsenowego [51].

1.5. Regulacja aktywności enzymu

1.5.1. Klasyczny mechanizm regulacji GS

Syntetaza glutaminy jest centralnym enzymem gospodarki azotu w organizmach żywych, ponieważ jest ściśle powiązana z wieloma szlakami biochemicznymi. Jej aktywność jest regulowana w bardzo skomplikowany sposób. Wpływa na nią bardzo wiele różnych czynników, a mechanizmy tej regulacji są bardzo wyrafinowane. Dzięki temu stężenia metabolitów powiązanych z tym enzymem są precyzyjnie kontrolowane a metabolizm azotu w komórce odpowiednio zbalansowany.

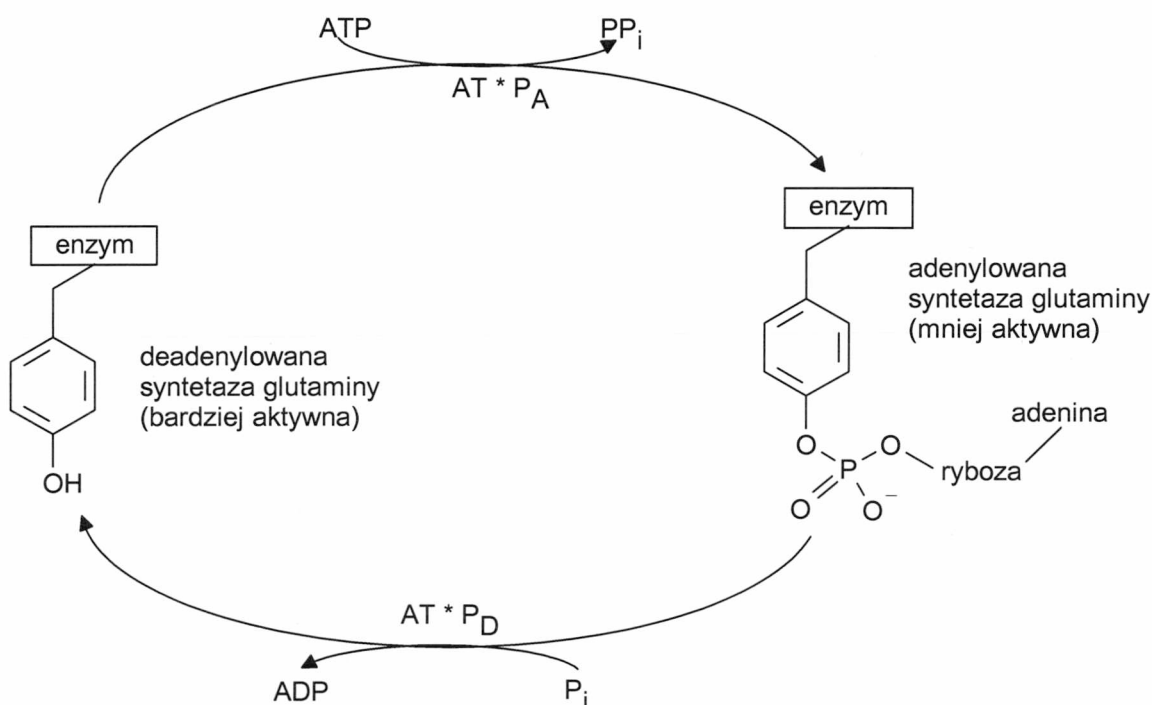
W przypadku syntetazy glutaminy wyróżniamy dwie główne ścieżki regulacji aktywności enzymu: kumulatywną inhibicję zwrotną i odwracalną modyfikację kowalencyjną.



Rysunek 1.8.

Produkty metaboliczne zawierające azot pochodzący z grupy amidowej glutaminy (odpowiednie atomy azotu zaznaczone na czerwono). Wszystkie te związki są regulatorami aktywności syntetazy glutaminy (dla uproszczenia rysunku grupę fosforanową oznaczono literą P a adeninę literą A).

Glutamina jest donorem azotu w biosyntezie wielu ważnych metabolitów (Rysunek 1.8). Do najważniejszych należą: glicyna (**16**), alanina (**17**), tryptofan (**19**), histydyna (**20**), fosforan karbamoilu (**15**), glukozamino-6-fosforan (**14**), CTP (**11**), AMP (**13**). Wszystkie te substancje hamują aktywność enzymu [67, 68]. Pomimo, że wcześniejsze badania biochemiczne sugerowały, że każdy z tych produktów ma własne miejsce oddziaływania z enzymem, badania przy użyciu rentgenografii strukturalnej [32] i NMR [69] wykazały, że wiążą się one do miejsca aktywnego i są prostymi inhibitorami kompetencyjnymi. Większość z nich posiada cechy strukturalne albo ATP albo glutaminianu.



Rysunek. 1.9.

Schemat regulowania aktywności syntetazy glutaminy poprzez adenylowanie / deadenylowanie.

Drugim sposobem regulacji jest kowalencyjna modyfikacja enzymu — adenylacja. Do tyrozyny 297 jest przyłączane AMP i pomimo tego, że miejsce to nie znajduje się blisko centrum aktywnego, enzym znacznie zmniejsza swoją aktywność. Zarówno reakcja adenylacji jak i deadenylacji jest katalizowana przez adenylotransferazę (AT) (Rysunek 1.9) [70]. Natomiast działanie AT jest sterowane przez białko regulatorowe, które może istnieć w dwóch formach P_A i P_D . Gdy forma P_A jest przyłączona do adenylotransferazy, katalizowana jest reakcja adenylacji, natomiast kompleks $AT \cdot P_D$ katalizuje reakcję deadenylacji. Kolejnym poziomem regulacji jest wzajemna izomeryzacja białek P_A i P_D . P_A jest transformowane w P_D po przyłączeniu dwóch cząsteczek UMP. Reakcja ta jest stymulowana przez zwiększony poziom ATP i kwasu ketoglutarowego, a hamowana przez glutaminę. Reakcja odwrotna jest hamowana przez kwas ketoglutarowy, a przyspieszana przez kwas glutaminowy. Ten wyrafinowany wielopoziomowy mechanizm regulacji pozwala na bardzo precyzyjny sposób sterowania ważnym fizjologicznie procesem. Podsumowując, w przypadku dużego stężenia glutaminy, syntetaza glutaminy zmniejsza swoją aktywność, zaś wysokie stężenie kwasu ketoglutarowego, związane z niedoborem azotu w

metabolizmie powoduje zwiększenie aktywności enzymu, co w dalszej kolejności daje zwiększony poziom glutaminy będącej donorem azotu w wielu reakcjach biochemicznych.

Ważnym aspektem takiego wielopoziomowego sposobu regulowania aktywności enzymu jest jego wysoka czułość [71]. Już niewielka zmiana stężenia istotnego metabolitu może spowodować znaczną zmianę aktywności enzymu. Jest to związane ze wzmocnieniem tego sygnału na każdym z poziomów regulacji. Wzmocnienie to zależy od ilości poziomów i parametrów kinetycznych poszczególnych równowag.

1.5.2. Regulacja aktywności GS w cyjanobakteriach

W większości organizmów regulacja syntetazy glutaminy opiera się głównie na systemie adenylacji/deadenylacji. Jednakże fakt, że jest to jeden z najstarszych funkcjonujących enzymów, spowodował rozwinięcie różnorodnych sposobów jego regulacji. Ciekawym przykładem jest syntetaza glutaminy z cyjanobakterii kontrolowana w zupełnie inny sposób niż klasyczna adenylacja [72-74]. Badania cyjanobakterii *Synechocystis* wykazały, że w regulacji tego enzymu biorą udział dwa peptydy: IF7 i IF17. Ekspresja genów *gifA* i *gifB* kodujących peptydy IF7 i IF17 zależy od stężenia jonów amonowych w komórce. Wartym odnotowania jest fakt, że w obu peptydach zawartość glutaminy i argininy jest bardzo wysoka (13.7% Gln i 12.5% Arg w IF7). Glutamina jest produktem syntetazy glutaminy, a arginina jest aminokwasem, który ma największą zawartość procentową azotu w cząsteczce. Wysoki poziom tych aminokwasów w komórce powoduje zwiększenie produkcji peptydów inhibitorowych i blokowanie enzymu, który uczestniczy w ich biosyntezie. Jest to szczególny rodzaj mechanizmu sprzężenia zwrotnego zależnego od stężenia produktów reakcji enzymatycznej [75].

Bezpośrednie przyłączenie IF7 lub IF17 do cząsteczki syntetazy glutaminy powoduje jej całkowitą dezaktywację. Peptydy mają wiele dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych, a ich punkty izoelektryczne wynoszą odpowiednio 11.2 (IF7) i 10.9 (IF17). Zależność siły wiązania od pH roztworu sugeruje, że te dodatnio naładowane cząsteczki wiążą się z syntetazą glutaminy głównie dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym. Co więcej, wykazano, że peptyd IF7 jest naturalnie nieuporządkowany, a zawartość struktur drugorzędowych jest marginalna [76]. Taka niezwarta struktura ma kluczowe znaczenie dla przyłączania się do enzymu i dla jego

dezaktywacji. Niska stała dysocjacji IF7 z GS ($K_D=0.3\pm0.1\mu\text{M}$) wykazuje, że proces ten jest bardzo wydajny.

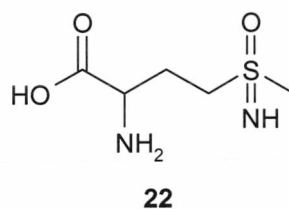
Porównując mechanizm regulacji opierający się na adenylacji enzymu i ten opierający się na kompleksowaniu peptydów IF7 i IF17, można zauważyć kilka istotnych różnic. Adenylacja powoduje jedynie zwiększenie czułości enzymu na inhibicję przez niektóre substancje, natomiast przyłączenie IF7 lub IF17 całkowicie blokuje enzym. Mechanizm adenylacji jest na pewno procesem szybszym niż modyfikacja ekspresji genów kodujących peptydy inhibitorowe. Proces kowalencyjnej modyfikacji GS wydaje się być także bardziej wyrafinowanym poprzez to, że kontrola jest wielopoziomowa i opiera się na wzmacnianiu wybranych sygnałów. Warto zaznaczyć, że regulacja aktywności przez peptydy inhibitorowe nie jest rzadkością i występuje także w przypadku wielu innych enzymów.

1.6. Inhibitory syntetazy glutaminy

Duże zainteresowanie syntetazą glutaminy doprowadziło do zbadania znacznej liczby inhibitorów. Jakkolwiek większość z nich została otrzymana syntetycznie, pewna grupa związków była wyizolowanych z organizmów żywych. Największe grupy syntetycznych inhibitorów GS stanowią analogi sulfoksyiminy metioniny i fosfinotricyny.

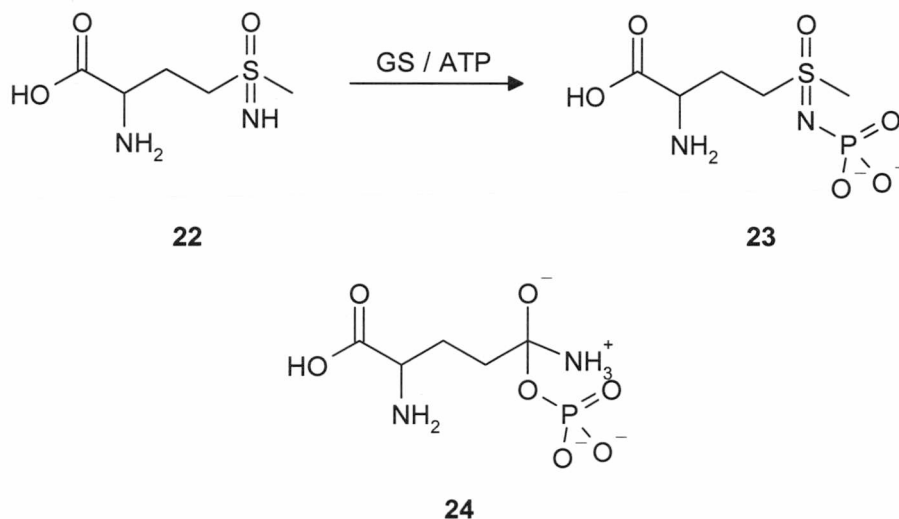
1.6.1. Sulfoksyimina metioniny i jej analogi

Sulfoksyimina metioniny (**22**) była pierwszym opisanym, silnym inhibitorem syntetazy glutaminy [77]. Pierwsze doniesienia na temat aktywności biologicznej tego związku pojawiły się już w roku 1949 [78], a w roku 1952 wykazano, że jest to silny inhibitor syntetazy glutaminy z mózgu [77].



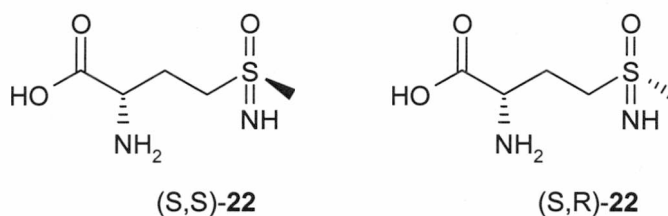
W kolejnych latach intensywnie badano mechanizm inhibicji. Udowodniono, że sulfoksyimina metioniny wiąże się nieodwracalnie z syntetazą glutaminy. Podobnie jak substrat reakcji — kwas glutaminowy, inhibitor ten jest fosforylowany w miejscu aktywnym enzymu przy udziale ATP (Schemat 1.3) [79]. Ufosforylowany związek jest właściwym inhibitorem enzymu i tylko w takiej formie jest on nieodwracalnie do niego

wiązany. Jest to typowy analog stanu przejściowego reakcji enzymatycznej, co prosto zauważyć porównując struktury **23** i **24**.

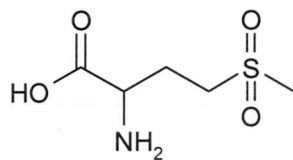


Schemat 1.3.

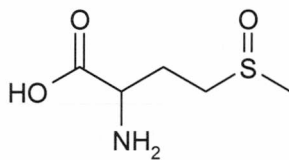
Sulfoksymina metioniny ma dwa centra chiralności: na atomie węgla i siarki. Początkowo dysponowano tylko mieszaninami diastereoizomerów RS-sulfoksyminą L-metioniny i RS-sulfoksyminą D-metioniny. Wykazano, że RS-sulfoksymina D-metioniny nie hamuje aktywności enzymu [80, 81]. Diastereoizomery RS-sulfoksyminy L-metioniny w postaci soli z kwasem (+)-kamfoleno-10-sulfonowym zostały rozdzielone chromatograficznie a absolutną konfigurację otrzymanych izomerów ustalono za pomocą rentgenografii strukturalnej. Mniej dokładne badania z roku 1969 wykazywały, że jedynie S-sulfoksymina L-metioniny hamuje enzym [82]. Jednakże pomiary z roku 1982 [83, 84] pokazały, że powinowactwo do enzymu wyznaczone dla izomeru S jest jedynie dziesięciokrotnie większe niż dla izomeru R. W obecności ADP powinowactwo izomeru S rośnie ok. 35-krotnie, natomiast dla izomeru R tylko 5-krotnie. Ostatecznie można stwierdzić, że enzym silnie preferuje S-sulfoksyminę L-metioniny względem pozostałych stereoizomerów tego związku.



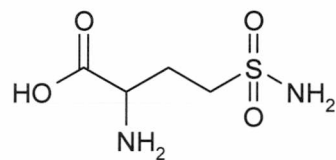
Przebadano także inne pochodne metioniny (związki **25-27**), zbliżone strukturalnie do **22** [80, 85, 86], oraz serię analogów strukturalnych sulfoksyminy metioniny (związki **28-33**) [87, 88]. Wykazano, że im bardziej związek pod względem strukturalnym zbliżony jest do inhibitora wiodącego, tym ma on większą aktywność.



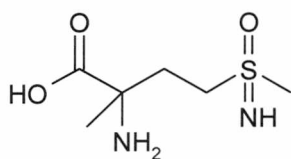
25



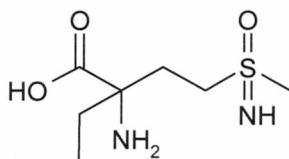
26



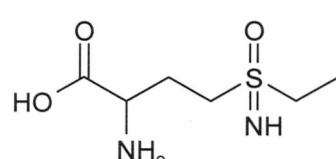
27



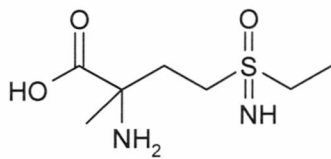
28



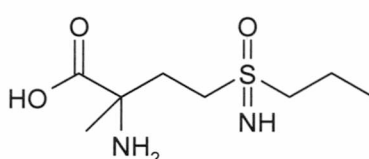
29



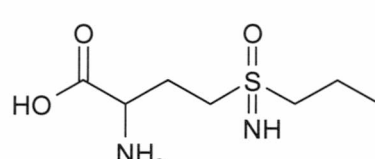
30



31



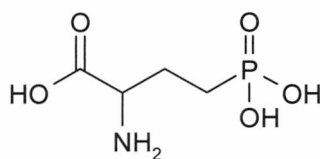
32



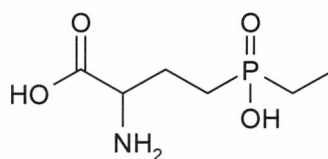
33

1.6.2. Fosfinotricyna i jej analogi

Pierwsze inhibitory syntetazy glutaminy zawierające atom fosforu otrzymano we Wrocławiu już w roku 1959 [89] (związki **34** i **35**)*. W zamyśle autorów grupa fosfonowa lub fosfinowa w tych związkach miała naśladować stan przejściowy reakcji enzymatycznej.



34

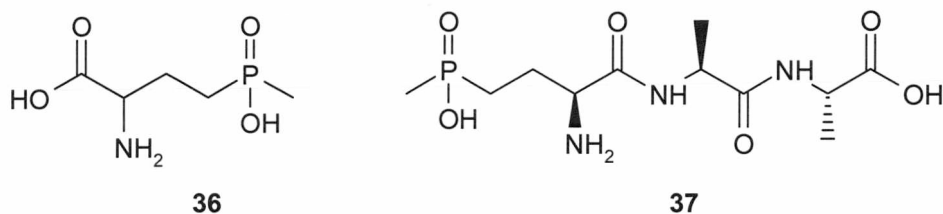


35

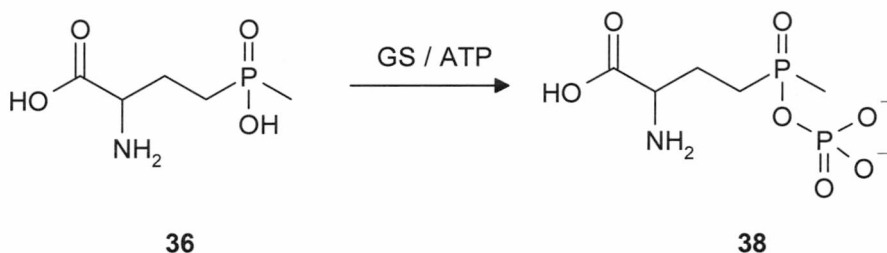
Prawdziwym przełomem było jednak wyizolowanie fosfinotricyny (**36**) z kultur bakterii *Streptomyces viridochromogenes*. Dokonały tego niezależnie dwie grupy

* Niestety ze względu na to, że nie znano metody syntezy dichlorometylofosfiny, nie była możliwa synteza fosfinotricyny, którą odkryto kilkanaście lat później.

badawcze: niemiecka i japońska [90, 91]. Fosfinotricyna występuje w tych bakteriach w postaci tripeptydu: fosfinotricylo-alanylo-alaniny (**37**). Związek ten jest obecnie najlepszym znanym inhibitorem syntetazy glutaminy zawierającym atom fosforu, ze stałą inhibicji dla enzymu z *E. coli* równą 1.6 μM [92].

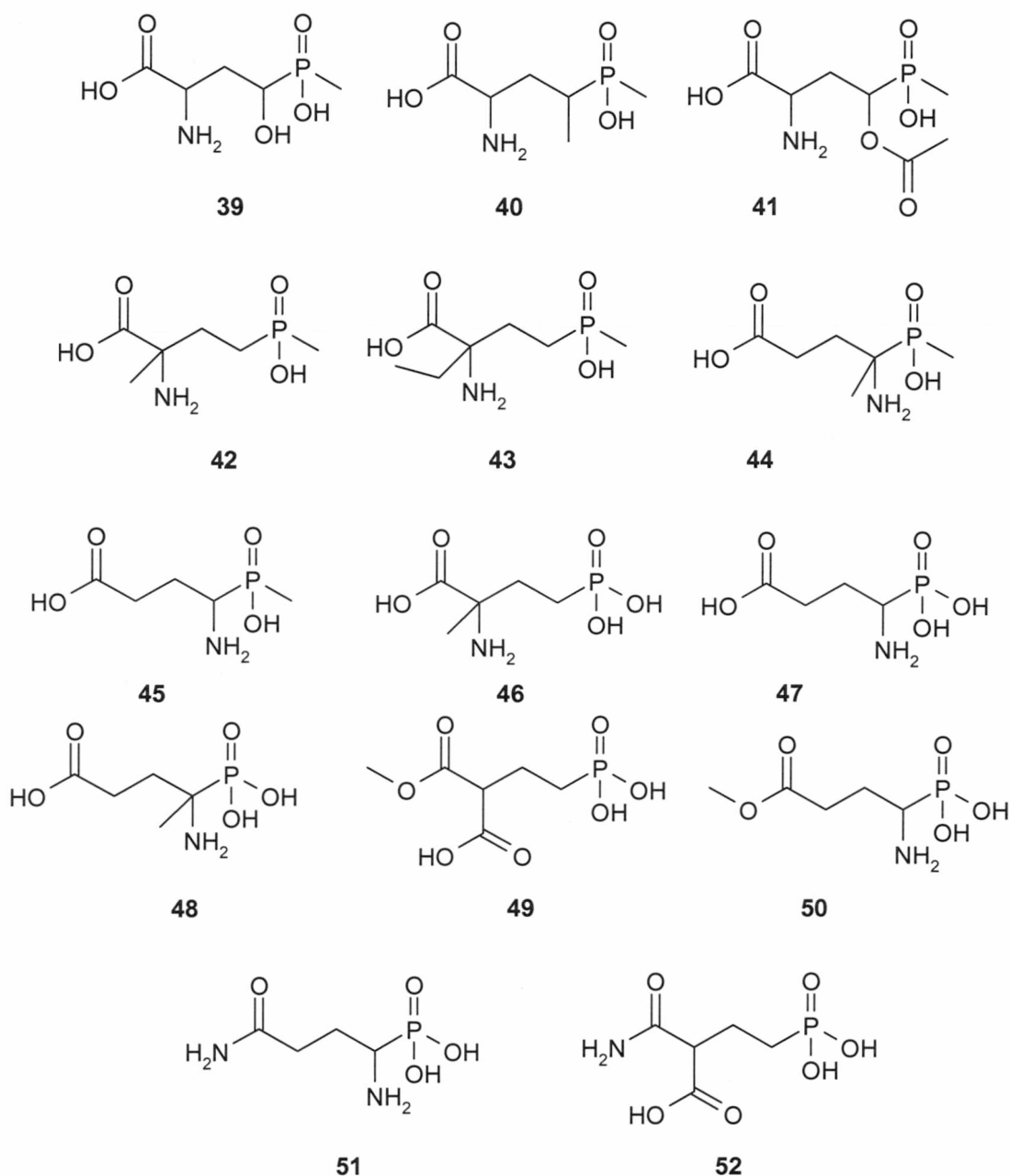


Szczegółowe badania wykazały, że mechanizm inhibicji enzymu przez fosfinotricynę jest analogiczny do tego znalezionej dla sulfoksyminy metioniny. W miejscu aktywnym enzymu jest ona fosforylowana przy udziale ATP [93, 94] i tak powstały związek (**38**) jest faktycznym, nieodwracalnym inhibitorem syntetazy glutaminy (Schemat 1.4).

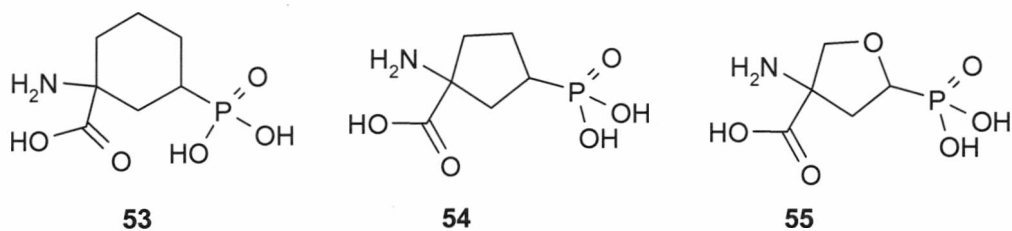


Schemat 1.4.

W nadziei na znalezienie bardziej aktywnych związków i w celu analizy miejsca aktywnego enzymu zsyntezowano wiele analogów strukturalnych fosfinotricyny i formalnego analogu glutaminianu — kwasu 2-amino-4-fosfonomasłowego (struktury **39-52**) [92, 95]. Badania te nie przyniosły jednak znaczącego sukcesu. Najprostszym wnioskiem, jakim można z nich wyciągnąć, jest to, że im struktura jest bliższa fosfinotricynie, tym związek jest bardziej aktywny. Jedyną modyfikacją, która nie spowodowała pogorszenia aktywności inhibitorowej było wprowadzenie grupy -OH w pozycji γ fosfinotricyny (związek **39**) [92, 96-99].

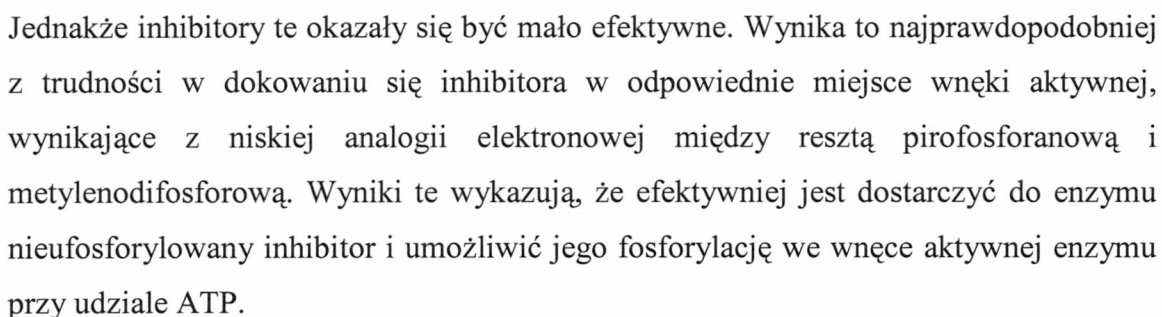


Ciekawym pomysłem było usztywnienie głównego łańcucha inhibitora przez wprowadzenie do struktury pierścienia alifatycznego (związki **53-55**) [98].

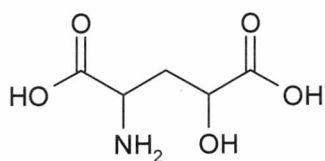


Taki zabieg powoduje zmniejszenie przestrzeni konformacyjnej związku i przez to mniejszą stratę entropii przy wiązaniu się inhibitora z enzymem. Najprawdopodobniej, ze względu na niewielkie rozmiary wnęki wiążącej glutaminian, tak skonstruowane

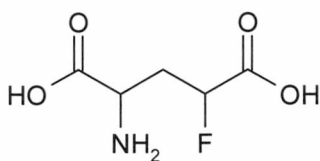
Próbowano także zwiększyć aktywność inhibitorową poprzez wprowadzenie do struktury badanego związku dodatkowej grupy fosfonowej. Tak skonstruowany inhibitor naśladuje ufosforylowany produkt przejściowy reakcji enzymatycznej (24) [100-102].



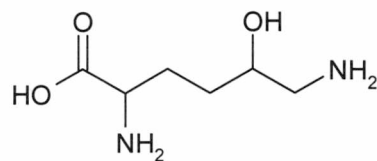
Już z badań biochemicznych wykonanych na organizmach żywych wiadomo, że aktywność syntetazy glutaminy jest blokowana przez szereg aminokwasów. Są to glicyna, alanina, seryna, histydyna, tryptofan [30]. Otrzymano też szereg syntetycznych analogów kwasu glutaminowego, będących inhibitorami syntetazy glutaminy. Są to związki takie jak kwasy: γ -hydrokso- lub γ -fluoroglutaminowy [103] (**59**, **60**), czy 5-hydroksylizyna (**61**) [104].



59

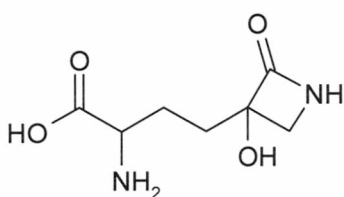


60

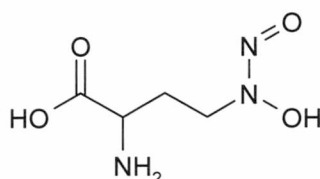


61

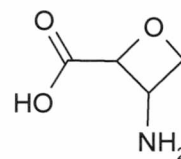
Wyizolowano także kilka dobrych inhibitorów syntetazy glutaminy z bakterii. Najlepszym z nich jest β -laktam tabtoksyny (**62**) produkowany przez *Pseudomonas tabaci* [105]. Ciekawymi strukturalnie inhibitorami są także alanozyna (**63**) produkowana przez *Streptomyces alanosinicus* [106] oraz oksetyna (**64**) wyizolowana ze *Streptomyces* sp. [107].



62

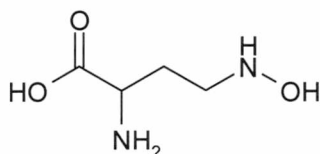


63



64

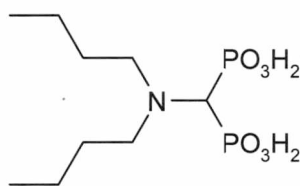
Na podstawie analizy struktur prostych inhibitorów GS grupa prof. Nozoe zaprojektowała bardzo dobry inhibitor syntetazy glutaminy (związek **65**) o stałych inhibicji równych 7 μ M względem enzymu z mózgu owcy i 21 μ M względem enzymu z soji [108].



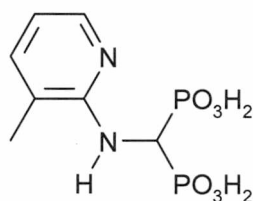
65

1.6.4. Bisfosfoniany

Aktywność biologiczna metylenobisfosfonianów była rozważana przede wszystkim w powiązaniu z ich działaniem przeciw osteoporozie, co wiąże się z wprowadzeniem ich do praktyki klinicznej [109-112]. Jednakże hamowanie syntetazy glutaminy przez tę klasę związków związane jest z ich właściwościami herbicydowymi. Tego typu aktywność bisfosfonianów znana była już w roku 1979 (związki **66**, **67**) [113-115], co jednak nie było szeroko badane aż do roku 1995 [116].

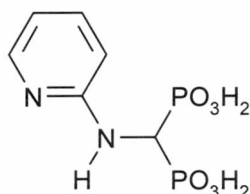


66

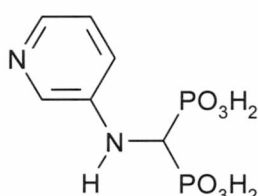


67

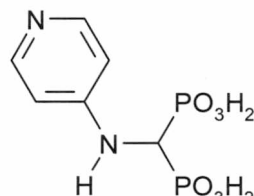
Pomimo, że bisfosfoniany stanowią grupę obiecujących herbicydów, sposób ich działania na poziomie molekularnym jest słabo poznany. Wstępne obserwacje ich oddziaływania na rośliny pozwoliły przypuszczać, że hamują one najbardziej podstawowe szlaki metaboliczne [117]. Zbadanie większej grupy związków (struktury 68-75) i próba powiązania ich aktywności herbicydowej ze strukturą nie dała jednak żadnych istotnych rezultatów [118-120].



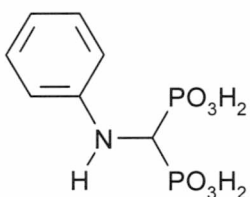
68



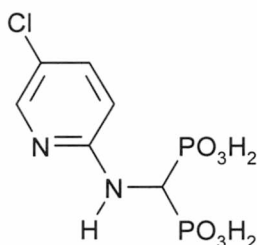
69



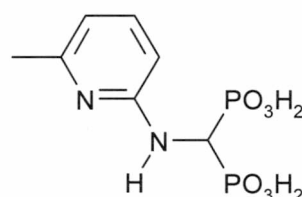
70



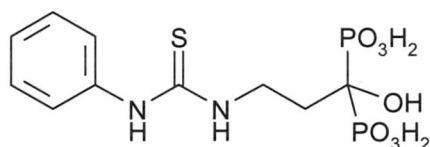
71



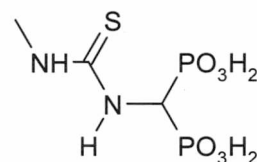
72



73

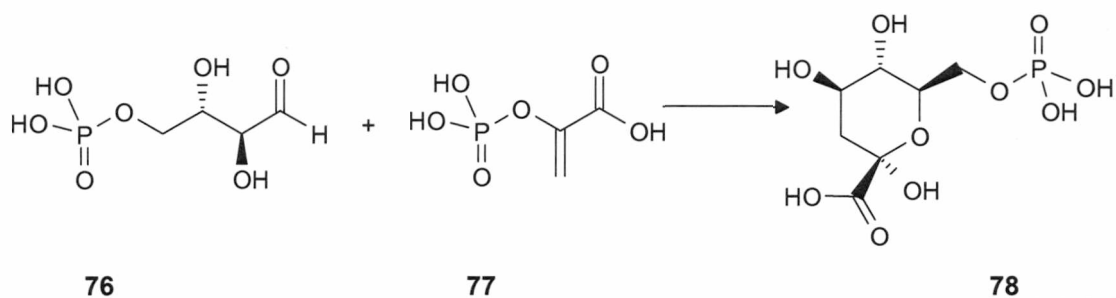


74



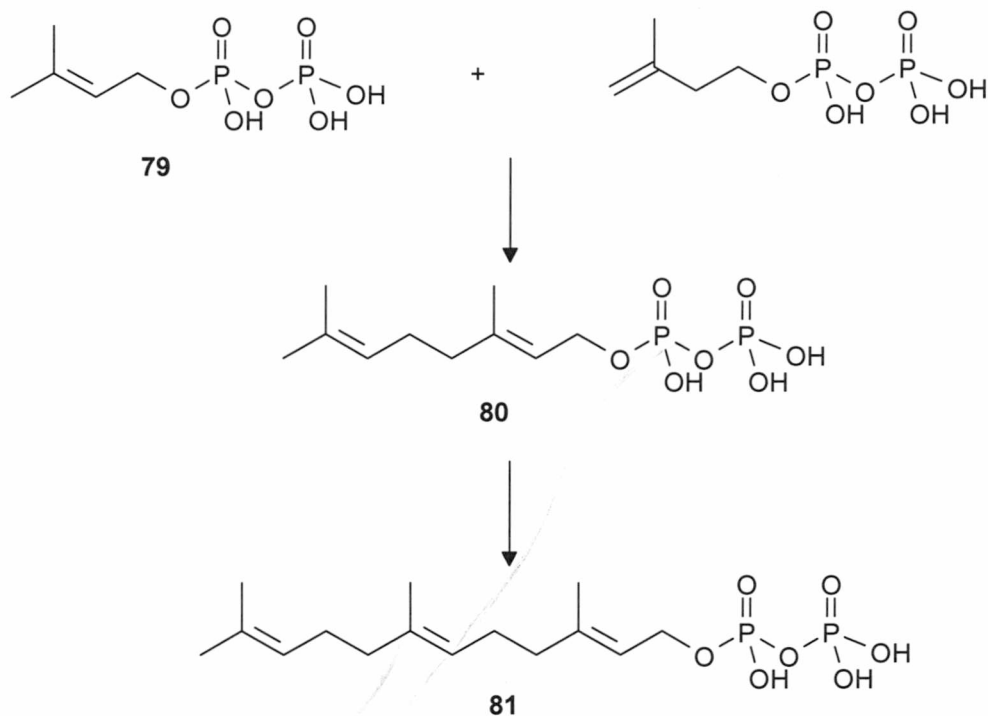
75

Na podstawie badań *in vivo* wykazano, że bisfosfoniany blokują biosyntezę antocyjanin, co pozwoliło przypuszczać, że hamują one bezpośrednio jeden z enzymów biosyntezy aminokwasów aromatycznych. Udowodniono, że hamowany jest pierwszy enzym ze ścieżki biosyntezy aminokwasów aromatycznych — syntaza 3-deoksy-D-arabino-heptulozo-7-fosforanu (EC 4.1.2.15; syntaza DAHP) [120-123]. Enzym ten katalizuje reakcję kondensacji fosfoenolopirogronianu (77) z erytrozo-4-fosforanem (76) (Schemat 1.4).



Schemat 1.4.

Wyniki innej grupy badawczej pokazały, że działanie bisfosfonianów jest powiązane z hamowaniem biosyntezy chlorofilu i karotenoidów, co wskazuje na hamowanie izoprenoidowej ścieżki biosyntezy tych związków [124-125]. Dezaktywowana jest syntaza pirofosforanu farnezylu (E.C. 2.5.1.10; transferaza prenylowa), która katalizuje syntezę pirofosforanu farnezylu (**81**) z pirofosforanu izopentenylu (**79**) poprzez pirofosforan geranylu (**80**) (Schemat 1.5).



Schemat 1.5.

Enzym ten uważany jest także za cel molekularny działania bisfosfonianów jako leków chorób kości. Przy użyciu modelowania molekularnego i obliczeń kwantowo-mechanicznych pokazano, że bisfosfoniany zawierające azot mogą być analogami stanu

przejściowego reakcji enzymatycznej i dobrze pasują do miejsca aktywnego tego enzymu [126-128].

Zablokowanie szikimianowej ścieżki biosyntezy aminokwasów aromatycznych w roślinach prowadzi do obniżenia poziomu fenyloalaniny i tyrozyny oraz zwiększenia ilości pozostałych aminokwasów*. Eksperymenty badające zawartość poszczególnych aminokwasów w komórkach roślinnych po podaniu związku **72** w dawkach subletalnych, wykazały zupełnie inny rozkład aminokwasów. Nie tylko zmniejszyło się stężenie aminokwasów aromatycznych, ale także obniżył się poziom glutaminy, asparaginy, argininy, kwasu glutaminowego i glicyny, co świadczy o blokowaniu enzymu odpowiedzialnego za gospodarkę azotu w organizmie [129]. Dalsze badania sprecyzowały, że blokowana jest syntetaza glutaminy. Ostatecznie wykazano, że związek ten blokuje jednocześnie co najmniej dwa enzymy: syntazę DAHP i GS.

1.7. Zastosowanie inhibitorów syntetazy glutaminy

Badania z wykorzystaniem inhibitorów syntetazy glutaminy wniosły duży wkład w poznanie biochemii tego enzymu. Umożliwiły one nie tylko scharakteryzowanie miejsca aktywnego enzymu i lepsze zrozumienie mechanizmu reakcji, ale dały także możliwość poznania zależności pomiędzy różnymi procesami biochemicznymi w komórce. Jednakże badania nad inhibitorami syntetazy glutaminy mają również charakter bardziej praktyczny. Szczegółowe przebadanie ich właściwości herbicydowych doprowadziło do wprowadzenia na rynek preparatu zawierającego fosfotricynę — jednego z najlepszych inhibitorów tego enzymu. Druga dziedzina praktycznych badań skupia się na zastosowaniu inhibitorów syntetazy glutaminy do walki z gruzlicą.

1.7.1. Herbicydy

Syntetaza glutaminy jest kluczowym enzymem w gospodarce azotu w roślinach, gdyż glutamina jest źródłem azotu w wielu reakcjach biochemicznych. Dodatkowo, enzym usuwa amoniak powstający w procesie redukcji azotanów, degradacji aminokwasów, czy też podczas fotooddychania. Wykazano, że inhibitory syntetazy glutaminy są dobrymi herbicydami totalnymi. Najlepszym, ze względu na wymagane

* Taki rozkład aminokwasów jest obserwowany przy zastosowaniu *N*-fosfonometyloglicyny — herbicydu, który blokuje jeden z enzymów biosyntezy aminokwasów, tj.: syntazę kwasu 5-fosfo-5-enolopirogroniano-szikimowego.

stężenie oraz dostępność syntetyczną wydaje się być fosfinotricyna [130-132]. Co więcej jest ona nietoksyczna dla ludzi i zwierząt, co jest warunkowane kilkoma czynnikami. Po pierwsze aktywność fosfinotricyny względem enzymów zwierzęcych jest kilkadziesiąt razy mniejsza niż względem enzymów roślinnych. Po drugie, fosfinotricyna nie przechodzi przez barierę krew-mózg i po trzecie, jest ona łatwo wydzielana przez nerki. Sulfoksymina metioniny także wykazuje aktywność herbicydową [133]. Wymagane jednakże jest jej większe stężenie, a w warunkach polowych szybko hydrolizuje [134-136]. Bardzo dobrą aktywność herbicydową przejawia także β -laktam tabtoksyny [137], niestety nie jest on łatwo dostępny na drodze syntezy chemicznej. Ostatecznie do rolnictwa została wprowadzona jedynie fosfinotricyna [138]. W Japonii firma Meiji Seika Ltd sprzedaje preparat Meiji Herbiace zawierający 32% białofosu (tripeptydu fosfinotricyny, **38**), który został dopuszczony do stosowania w roku 1984. W Europie preparat zawierający jako substancję czynną fosfinotricynę jest sprzedawany pod handlową nazwą BASTA przez firmę Aventis.

Mechanizm działania fosfinotricyny jako herbicydu jest skomplikowany. Jest on związany z dwoma istotnymi faktami: a) zahamowanie aktywności syntetazy glutaminy powoduje gromadzenie się toksycznego amoniaku w roślinie [136, 139, 140] oraz b) zatrzymuje proces fotosyntezy [135, 140, 141]. Gromadzenie się amoniaku w organizmie wynika prosto ze stechiometrii reakcji katalizowanej przez enzym, natomiast mechanizm blokowania fotosyntezy nie jest już tak oczywisty. Badania pokazują, że inhibicja syntetazy glutaminy niszczy skomplikowane zależności pomiędzy metabolizmem węgla i azotu w roślinach, co silnie wpływa na fotosyntezę [142, 143]. Fotosynteza jest hamowana tylko w warunkach atmosferycznych. Gdy fotooddychanie nie może zachodzić (w atmosferze o niskiej zawartości tlenu: 2% O₂ i 1000ppm CO₂), nie obserwowano inhibicji fotosyntezy przez fosfinotricynę [140, 144-147]. Na tej podstawie stwierdzono, że proces hamowania fotosyntezy bazuje na inhibicji części procesu fotooddychania [148]. Zahamowanie syntetazy glutaminy w roślinie powoduje spadek stężenia zarówno glutaminy jak i glutaminianu. Wskazuje to na brak możliwości transaminacji glioksalanu do glicyny [149]. W wyniku tego efektu w roślinie gromadzi się znaczny nadmiar gliokolanu i glioksalanu. Gliokolan natomiast hamuje aktywność najważniejszego z enzymów fotosyntezy — RUBISCO [150].

Totalne działanie herbicydowe fosfinotricyny w warunkach polowych nie zawsze jest pożądane. Najnowsze technologie w rolnictwie powinny umożliwiać eliminowanie tylko roślin niepożądanych, a wzmacnianie tych uprawianych. Dlatego

też prowadzone są intensywnie badania nad zmodyfikowanymi genetycznie roślinami uprawnymi, które byłyby odporne na działanie fosfinitricyny. Zostały przeanalizowane dwa sposoby rozwiązania tego problemu. Pierwsza strategia opiera się na izolowaniu genu syntetazy glutaminy z komórek, które są odporne na ten herbicyd i ekspresjonowanie ich w roślinie. Na przykład, dokonano selekcji komórek lucerny, które były 20-100 razy bardziej odporne na fosfinitricynę, niż komórki typu dzikiego [151]. Dodatkowo aktywność syntetazy glutaminy w tak wybranych komórkach była 3-7 razy większa. Badania cDNA kodującego ten enzym wykazały, że jest on nadprodukowany w odpornych komórkach, co jest osiągane poprzez zwiększony poziom mRNA.

Drugie podejście bazuje na ekspresjonowaniu enzymu, który detoksyfikuje fosfinitricynę. Enzymem takim jest transferaza acetylofosfinitricyny (PAT) ze *Streptomyces hygroscopicus* katalizująca reakcję acetylowania L-demetylofosfinitricyny w czasie biosyntezy fosfinitricyny [152]. Enzym ten ma wysokie powinowactwo do fosfinitricyny ($K_m=0.06\text{mM}$) i znacznie niższe do L-glutaminianu, sulfoksyminy L-metioniny i δ -hydroksylizyny (K_m wynoszą odpowiednio 240, 36, 56mM). Gen kodujący PAT został sklonowany i przy użyciu odpowiedniego promotora wprowadzony do komórek roślinnych. Tak zmodyfikowany tytoń był odporny na dawkę fosfinitricyny przewyższającą 4-10 razy dawkę potrzebną do usunięcia innych roślin. Gen udało się także wprowadzić do komórek pomidorów i ziemniaków [153]. Tak stworzone transgeniczne rośliny normalnie kwitły i produkowały ziarno na normalnym poziomie [154]. Poziom amoniaku w tych roślinach po podaniu herbicydu był niezmienny, co udowadnia ich całkowitą odporność.

1.7.2. Leki przeciwgruźlicze

Pomimo znacznego rozwoju badań farmaceutycznych gruźlica jest ciągle jednym z poważniejszych problemów medycyny. Bakterią powodującą zachorowania jest *Mycobacterium tuberculosis*. Powoduje ona największą śmiertelność spośród chorób wywoływanych przez pojedynczy patogen. Znalezienie dobrego celu molekularnego dla leków na gruźlicę jest kluczowym zadaniem na obecnym etapie walki z tą chorobą. Uruchomiony został duży projekt genomiki strukturalnej, który ma na celu wyznaczenie struktur ponad 400 enzymów z tej bakterii i ich analizę w kontekście znalezienia leku na gruźlicę [155]. Jednym z wyselekcjonowanych enzymów

jest syntetaza glutaminy, dla której wyznaczono strukturę krystaliczną, co umożliwia projektowanie specyficznych inhibitorów [26].

Wybór syntetazy glutaminy ma także podstawy w badaniach biochemicznych. *M. tuberculosis* wydziela podczas wzrostu znaczne ilości białek do przestrzeni międzykomórkowej [156], a jednym z ważniejszych jest syntetaza glutaminy. Wzbudza ona szczególne zainteresowanie ze względu na powiązanie z patogenicznością [157-159], ponieważ tylko bakterie powodujące gruźlicę wydzielają ten enzym. Związane jest to z budową struktury poli-glutaminian/glutamina w ich ścianie komórkowej [160].

Wykazano, że sulfoksyimina metioniny nie tylko powoduje hamowanie wydzielonego enzymu *in vitro*, ale także działa *in vivo* [158]. Blokuje tworzenie struktury poli-glutaminian/glutamina w ścianie komórkowej i przez to hamuje wzrost bakterii. Inhibitor nie przekracza bariery ściany komórkowej, co powoduje, że blokowany jest tylko rozwój patogenów. Dodatkowo, sulfoksyimina metioniny jest zupełnie nietoksyczna dla ssaków, ponieważ ich syntetaza glutaminy jest 100 razy mniej wrażliwa na ten związek. Działanie tego związku badano używając świnki morskiej jako organizmu testowego. Udowodniono, że jest on efektywnym antybiotykiem i wspomaga działanie używanego w praktyce klinicznej izoniazydu, a więc może być użyty w terapii wielolekowej [161].

2. Cel pracy

Niniejsza praca ma charakter interdyscyplinarny i łączy w sobie wykorzystanie różnych metod obliczeniowych i modelowania molekularnego do lepszego zrozumienia sposobu działania znanych oraz projektowanie nowych inhibitorów z syntezą tych inhibitorów metodami chemii organicznej. Natomiast eksperymentalne wyznaczenie stałych inhibicji otrzymanych związków, czyli weryfikacja projektowania nie wchodziło w zakres rozprawy. Celem badań prowadzonych w ramach prezentowanej pracy było:

- a) lepsze zrozumienie herbicydowego działania pochodnych kwasu aminometylenobisfosfonowego na poziomie molekularnym z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego;
- b) zbudowanie teoretycznego modelu opisującego zależność aktywności inhibitorowej pochodnych kwasu aminometylenobisfosfonowego względem syntetazy glutaminy od ich struktury przy pomocy metody CoMFA/3D-QSAR;
- c) analiza sposobu wiązania znanych inhibitorów do syntetazy glutaminy i wskazanie istotnych cech strukturalnych i elektronowych, jakie winien spełniać dobry inhibitor;
- d) racjonalne zaprojektowanie nowych inhibitorów syntetazy glutaminy w oparciu o jej strukturę krystaliczną i przy użyciu metod modelowania molekularnego;
- e) synteza serii zaprojektowanych pochodnych fosfinotricyny i kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego w formie enancjomerycznie czystej.

3. Wyniki i dyskusja

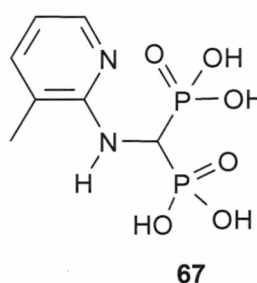
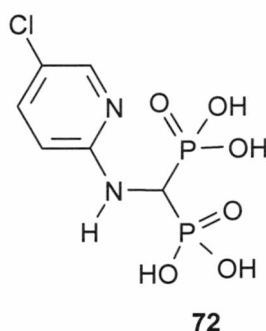
Aby zrealizować cel pracy — znalezienie dobrych inhibitorów syntetazy glutaminy, badania prowadzono w dwóch kierunkach. Po pierwsze, podjęto próby analizy aktywności inhibitorowej pochodnych kwasu aminometylenobisfosfonowego i po drugie, realizowano projekt badawczy dotyczący analogów glutaminianu.

W części badań poświęconych bisfosfonianom (rozdziały 3.1 i 3.2) zdefiniowano podstawy molekularne ich działania herbicydowego. Zaproponowano sposób wiązania bisfosfonianów przez syntetazę glutaminy i określono istotne oddziaływania z wnęką enzymatyczną. Skorelowano także eksperymentalne dane dotyczące inhibicji tego enzymu z roślin z cechami strukturalnymi i elektrostatycznymi badanych związków.

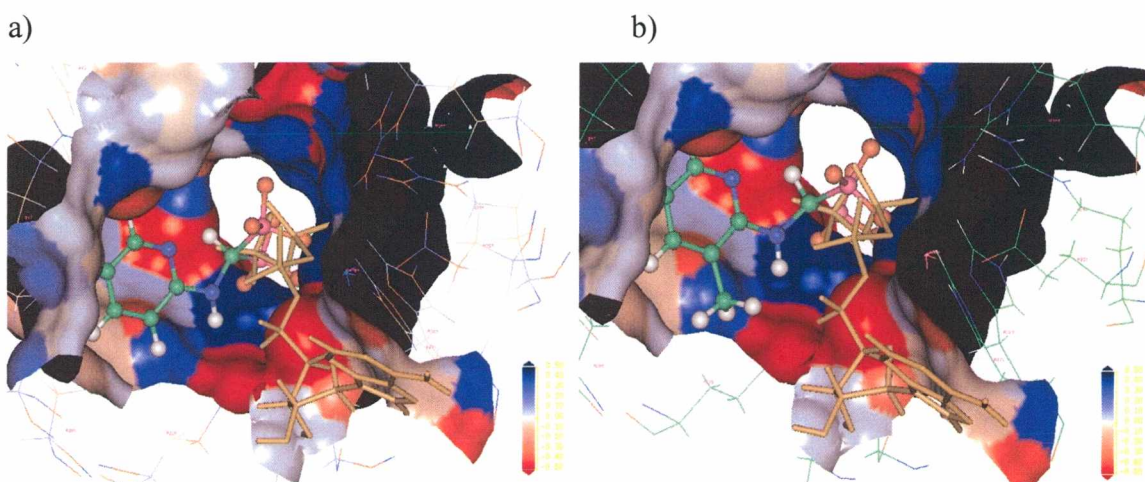
Druga część pracy opierała się na lepiej poznanych inhibitorach — analogach glutaminianu. Zanalizowano sposób wiązania szeregu znanych inhibitorów w centrum aktywnym enzymu i wskazano istotne elementy strukturalne i elektronowe ważne dla wysokiej aktywności tych inhibitorów (rozdział 3.3). Następnie zaprojektowano szereg nowych, potencjalnych inhibitorów będących analogami fosfinotricyny (rozdział 3.4) i kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego (rozdział 3.6). Z obu zaprojektowanych zbiorów związków wybrano te, które wydawały się być syntetycznie dostępne i podjęto próby ich otrzymania (rozdziały 3.5 i 3.7). Otrzymane związki zostały poddane wstępnym testom *in vitro* określającym ich aktywność inhibitorową względem syntetazy glutaminy z *E. coli* (rozdział 3.8).

3.1. Analiza sposobu działania herbicydowo aktywnych bisfosfonianów

Analiza danych biochemicznych dotyczących aktywności herbicydowej bisfosfonianów wykazuje, że sposób ich działania jest wieloraki. Do tej pory wykazano, że mogą one hamować trzy enzymy: syntazę 3-deoksy-D-arabino-heptulozo-4-fosforanu (EC 4.1.2.15; DAHPS), syntazę pirofosforanu farnezyli (EC 2.5.1.10; FPS) i syntetazę glutaminy (EC 6.3.1.2; GS) [120, 125, 129]. Spośród zbadanych bisfosfonianów wybrano dwa (związki **72** i **67**), których aktywność herbicydowa była największa i znane były ich stałe inhibicji względem DAHPS i GS [120, 129]. Wybrane bisfosfoniany zostały zadokowane we wnękach katalitycznych tych trzech enzymów. Aby dokładniej zrozumieć sposób działania herbicydowego tej klasy związków szczegółowo przeanalizowano ich oddziaływanie w centrach aktywnych. Zastosowanie identycznych procedur obliczeniowych pozwoliło porównać aktywność inhibitorową wybranych związków (**72** i **67**) względem trzech badanych enzymów.



Struktura omawianych bisfosfonianów nie przypomina żadnego znanego inhibitora syntetazy glutaminy. Dotychczas opisane inhibitory tego enzymu są prostymi analogami glutaminianu i wiążą się w jego miejsce w centrum aktywnym enzymu [14]. Po dokładnym przeanalizowaniu całego miejsca aktywnego syntetazy glutaminy, w pobliżu miejsca wiązania grupy trójfosforanowej ATP została znaleziona wnęka, która wydaje się być najbardziej prawdopodobnym miejscem wiązania bisfosfonianów. Zgodnie z opublikowanymi danymi biochemicznymi wnęka ta nie ma ważnej roli fizjologicznej. Nałożenie fragmentu bisfosfonowego badanych związków na grupę pirofosforanową ATP związanego we wnęcie katalitycznej enzymu i następnie zoptymalizowanie otrzymanego kompleksu enzym-inhibitor pozwoliło na otrzymanie kilku różnych struktur (z różnymi konformacjami inhibitorów) (Rysunek 3.1).



Rysunek 3.1.

Inhibitory **72** (a) i **67** (b), zadokowane w syntetazie glutaminy. Powierzchnia enzymu z zaznaczonym rozkładem ładunku – od ujemnego (czerwony) do dodatniego (niebieski). Przedstawiono także sposób wiązania ATP (pomarańczowy).

Najwyższe wartości funkcji oceniających z programu LUDI [162-164] dla kompleksów obu badanych związków przedstawiono w Tabeli 3.1*. Znaczące wartości IONIC_SCORE pokazują, że w kompleksie enzym-inhibitor oddziaływania typu elektrostatycznego są najistotniejsze. Są one związane z oddziaływaniem dwóch grup fosfonowych z dwoma kationami magnezu, które znajdują się we wnętrzu katalitycznej. Oddziaływania typu hydrofobowego (LIPO_SCORE) pomiędzy pierścieniem pirydynowym a enzymem są oceniane na trzykrotnie słabsze od jonowych. W strukturach tych nie znaleziono żadnych wiązań wodorowych stabilizujących kompleks (HB_SCORE).

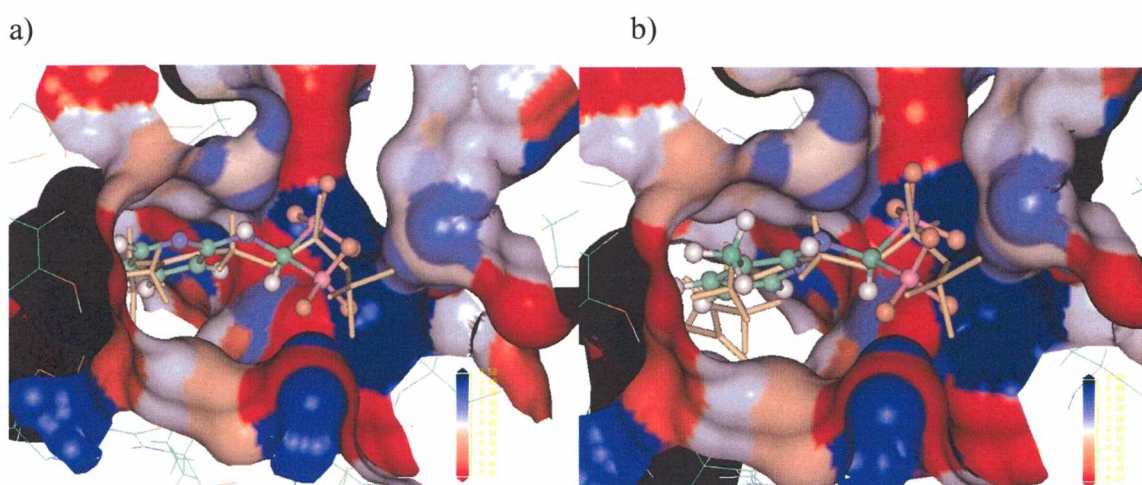
Tabela 3.1.

Porównanie wartości funkcji oceniającej LUDI_1 dla ATP i bisfosfonianów zadokowanych w centrum aktywnym syntetazy glutaminy.

Związek	LUDI_1	HB_SCORE	LIPO_SCORE	IONIC_SCORE
Substrat: ATP	504	234	219	197
72	600	0	186	586
67	596	0	180	588

* W niniejszej pracy funkcje opisujące oddziaływania pomiędzy ligandem a receptorem (ang. *scoring function*) są nazywane funkcjami oceniającymi. Termin ten wydaje się być bardziej adekwatny niż określenie 'funkcja wynikowa' stosowane przez J. Grembecką [165].

Bisfosfoniany **72** i **67** są natomiast podobne strukturalnie do substratu i produktu reakcji katalizowanej przez syntazę pirofosforanu farnezyłu. Zarówno pirofosforan geranylu (GPP) (substrat) i pirofosforan farnezyłu (produkt) jak i analizowane związki posiadają dwie grupy fosforowe na jednym końcu cząsteczki i płaski hydrofobowy podstawnik na drugim końcu. Fosfonowe grupy związków **72** i **67** zostały nałożone na pirofosforanową grupę substratu i po zoptymalizowaniu kompleksu bisfosfonian-enzym otrzymano kilka struktur inhibitor-enzym (dla różnych konformacji startowych bisfosfonianu) (Rysunek 3.2). Otrzymane w tej pracy położenie inhibitorów we wnętrzu aktywnej enzymu jest bardzo bliskie do tego, które było przedstawione we wcześniejszych pracach [128]. Struktury te zostały ocenione przy pomocy funkcji z programu LUDI i najwyższe oceny przedstawiono w Tabeli 3.2. Podobnie jak w przypadku kompleksów z udziałem syntetazy glutaminy, najważniejsze jest oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy grupami fosfonowymi inhibitora a jonami magnezu z centrum aktywnego. Oddziaływania typu lipofilowego są także istotne. Z powodu zawady sterycznej spowodowanej przez grupę metylową związku **67**, sposób jego wiązania z enzymem nie jest optymalny i jest to uwidocznione poprzez znacząco mniejszą wartość ogólnej oceny LUDI_1.



Rysunek 3.2.

Inhibitory **72** (a) i **67** (b), zadokowane w syntazie pirofosforanu farnezyłu. Powierzchnia enzymu z zaznaczonym rozkładem ładunku – od ujemnego (czerwony) do dodatniego (niebieski). Przedstawiono także sposób wiązania GPP (pomarańczowy).

Tabela 3.2.

Porównanie wartości funkcji oceniającej LUDI_1 dla GPP i bisfosfonianów zadokowanych w centrum aktywnym syntazy pirofosforanu farnezylu.

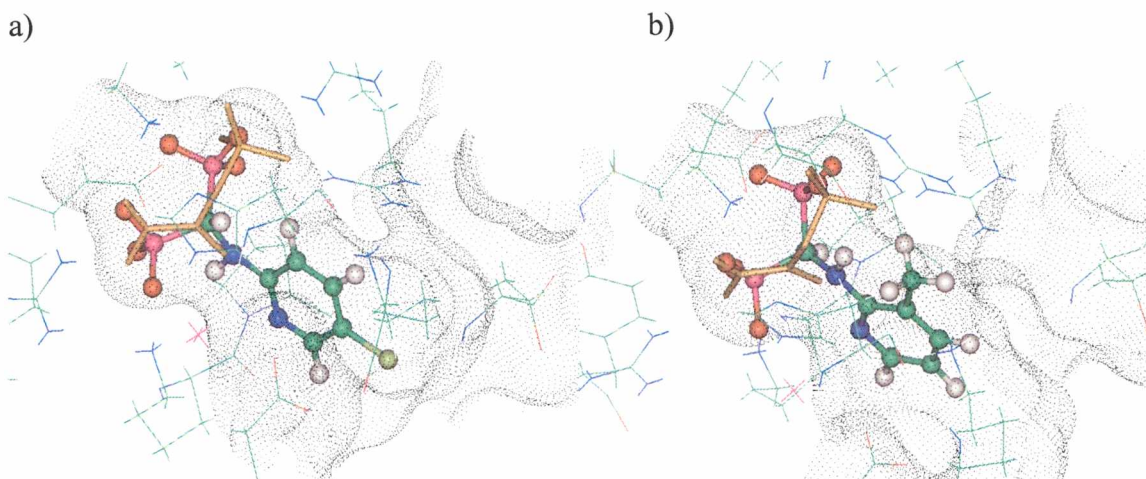
Związek	LUDI_1	HB_SCORE	LIPO_SCORE	IONIC_SCORE
Substrat: GPP	394	222	394	0
72	675	39	228	580
67	540	13	175	524

Analizując możliwość hamowania syntazy DAHP przez bisfosfoniany, można zauważyć, że jeden z substratów tej reakcji — kwas fosfoenolopirogronowy (PEP) ma strukturę bardzo podobną do grupy metylenobisfosfonowej. Przez nałożenie grupy metylenobisfosfonowej na kwas fosfoenolopirogronowy i optymalizację struktury otrzymano kilka kompleksów badanych bisfosfonianów z syntazą DAHP, które następnie zostały ocenione przez funkcję z programu LUDI. Kompleksy z największymi wartościami funkcji oceniającej i wartości poszczególnych składowych tej oceny zaprezentowano na Rysunku 3.3 i w Tabeli 3.3. Rozkład ocen poszczególnych typów oddziaływań (jonowe, hydrofobowe i wiązania wodorowe) jest podobny do dwóch opisanych już przypadków.

Tabela 3.3.

Porównanie wartości funkcji oceniającej LUDI_1 dla PEP i bisfosfonianów zadokowanych w syntazie DAHP.

Związek	LUDI_1	HB_SCORE	LIPO_SCORE	IONIC_SCORE
Substrat: PEP	439	272	80	183
72	548	39	213	468
67	531	20	231	452



Rysunek 3.3.

Inhibitory **72** (a) i **67** (b), zadokowane w syntazie DAHP. Przedstawiono także sposób wiązania PEP (pomarańczowy).

Porównanie wyników funkcji oceniającej i wartości obliczonych stałych inhibicji dla obu bisfosfonianów w stosunku do wszystkich trzech analizowanych enzymów pokazuje, że związki te powinny być umiarkowanymi inhibitorami tych enzymów (Tabela 3.4). Ten wniosek jest zgodny z danymi eksperymentalnymi, pomimo tego, że wartości eksperymentalne K_i są większe niż te obliczone. Co więcej, oczekiwana podobna aktywność inhibitorowa względem każdego z enzymów ma odzwierciedlenie w podobnych wartościach funkcji oceniającej. Podobny jest także rozkład poszczególnych typów oddziaływań pomiędzy enzymem i inhibitorem, gdzie najważniejsze jest elektrostatyczne oddziaływanie pomiędzy dwoma grupami fosfonowymi bisfosfonianu i centrum aktywnym. Dodatkowo, pierścień aromatyczny inhibitora jest ułożony we wnęce wiążącej dzięki oddziaływaniom hydrofobowym, natomiast udział wiązań wodorowych jest pomijalny. Taki sposób wiązania powoduje, że jest wysoce prawdopodobne, że bisfosfoniany hamują także inne metalo-enzymy w podobny sposób, zwłaszcza wtedy, gdy jeden z substratów reakcji enzymatycznej zawiera grupę pirofosforanową. Obliczenia te potwierdziły hipotezę, że najprawdopodobniej bisfosfoniany są heterogeniczną grupą związków o różnym molekularnym mechanizmie działania. Ich wysoka aktywność herbicydowa wydaje się być rezultatem jednoczesnego hamowania więcej niż jednego enzymu.

Tabela 3.4.

Porównanie obliczonych i eksperymentalnych wartości stałej inhibicji (K_i) dla związków **72** i **67**.

enzym	inhibitor	obliczone K_i [μ M]	eksperymentalne K_i [μ M] (względem)	Lit.
Syntetaza glutaminy	72	1.0	97 (Glu), 113 (NH_3), 39 (ATP)	[129]
	67	1.1	Nie hamuje	
Syntaza pirofosforanu farnezyłu	72	0.18	Brak danych w literaturze	
	67	3.4	Brak danych w literaturze	
Syntaza DAHP	72	3.3	140 (E4P) 60 (PEP)	[120]
	67	4.9	Brak danych w literaturze	

Można także zauważyć pewne różnice w wiązaniu badanych inhibitorów. W przypadku syntetazy glutaminy i syntazy pirofosforanu farnezyłu sposób wiązania jest bardzo podobny i opiera się głównie na oddziaływaniu grup fosfonowych z dwoma jonami metalu (magnezu lub manganu). W przypadku syntazy DAHP rozkład oddziaływań jest inny, jedna z grup fosfonowych oddziałuje z jonem metalu, natomiast druga jest związana elektrostatycznie z kilkoma dodatnio naładowanymi resztami lizyn i arginin obecnych w centrum aktywnym enzymu. Ten sposób wiązania jest jednak zbliżony energetycznie do oddziaływania z jonem metalu.

Obliczone stałe inhibicji bisfosfonianów **72** i **67** względem badanych enzymów nie oddawały dobrze wartości eksperymentalnych. Oszacowany błąd metody (program LUDI) wynosi około jednostki w skali $\text{p}K_i$, podczas gdy obserwowane różnice wynosiły około dwóch jednostek $\text{p}K_i$, co wydaje się być za dużo. Ta różnica wynika najprawdopodobniej z faktu, że pomiary wykonywane były przy użyciu enzymów roślinnych, natomiast obliczenia wykonywano bazując na strukturach enzymów z innych źródeł, co podyktowane było dostępnością struktur krystalicznych. W celu oszacowania zgodności struktur białek użytych w badaniach eksperymentalnych i wykorzystanych w badaniach teoretycznych, sekwencje kodujące badanych enzymów z

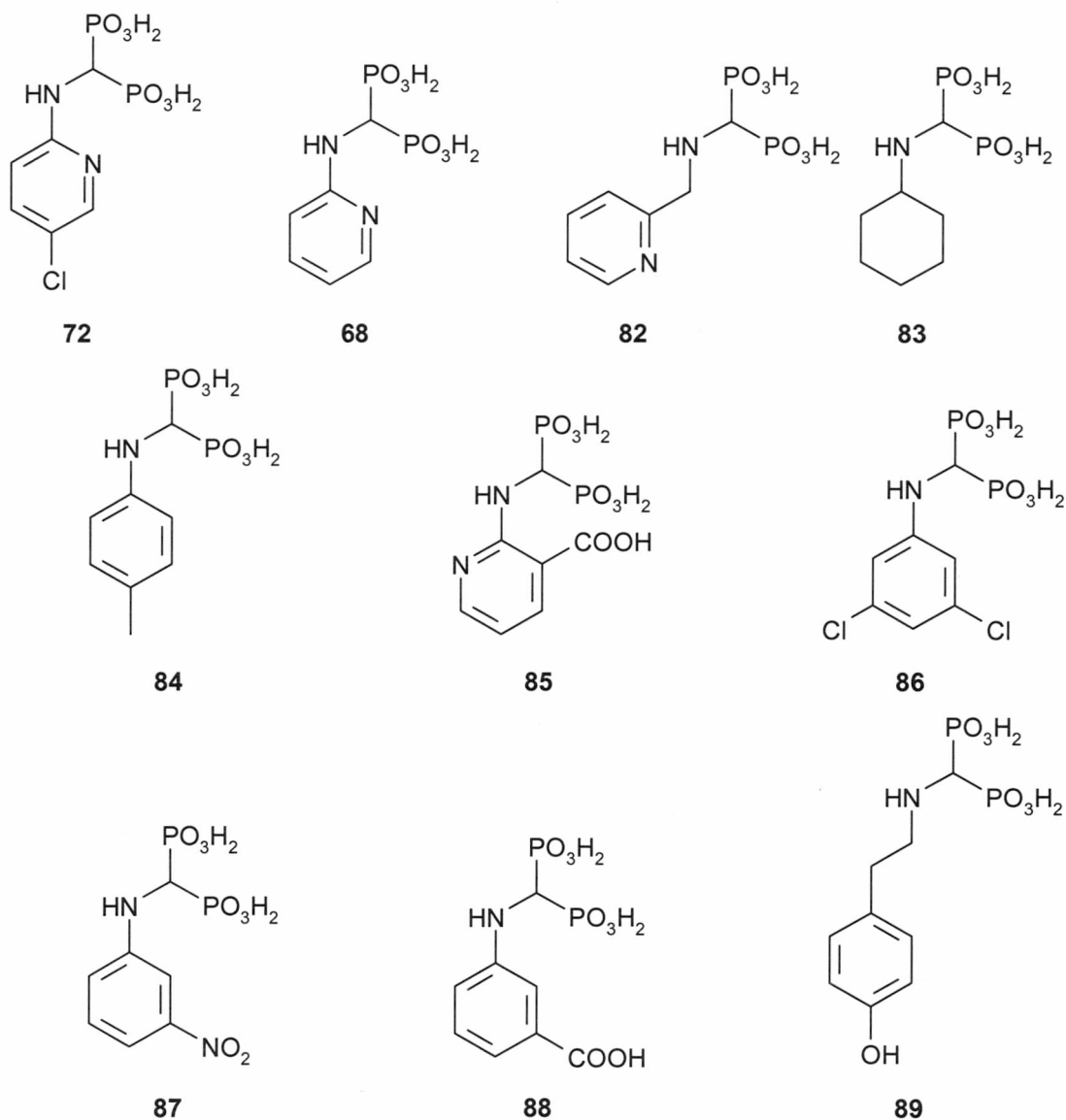
różnych źródeł były porównywane przy pomocy programu ClustalW [166, 167]. Z tego porównania można było łatwo odczytać, że sekwencje kodujące aminokwasy, które budują centrum aktywne są bardzo podobne niezależnie od źródła enzymu. Jest to szczególnie ważne w przypadku syntazy FPP i syntazy DAHP, ponieważ nasze obliczenia, zgodnie z wcześniej opublikowanymi dla pierwszego enzymu [128], pokazały, że inhibitory te zastępują substrat w trakcie wiązania się z enzymem.

Badane bisfosfoniany wiążą się z syntetazą glutaminy w zupełnie inny sposób, ponieważ pierścień aromatyczny jest umieszczany w hydrofobowej wnęce, która nie pełni najprawdopodobniej żadnej ważnej funkcji fizjologicznej. Analiza genów kodujących enzymy roślinne i bakteryjne wykazała, że są one ulokowane w różnych gałęziach drzewa filogenetycznego [9, 13, 14] i wykazują niską homologię (Rysunek 1.1). Nie było więc możliwe porównanie struktur przestrzennych omawianej wnęki w enzymach roślinnych i bakteryjnych. Różnice topologiczne tych wnęk mogą powodować bardzo duże rozbieżności pomiędzy obliczonymi i eksperymentalnymi wartościami pK_i . Strukturalna różnica pomiędzy związkami **72** i **67** wydaje się być subtelna, jednakże może ona powodować ogromne zmiany w geometrii całej cząsteczki i w wiązaniu do sterycznie wymagającej wnęki enzymu. Podobne zjawisko jest obserwowane podczas wiązania tych związków z syntazą pirofosforanu farnezyli, gdzie obecność grupy metylowej w pozycji 3 pierścienia pirydynowego powoduje powstanie niekorzystnych oddziaływań sterycznych pomiędzy enzymem a tym fragmentem inhibitora.

Podsumowując, można stwierdzić, że przedstawione obliczenia pokazują, iż sposób działania herbicydowo aktywnych bisfosfonianów jest skomplikowany i związki te mogą oddziaływać w wieloma enzymami równocześnie z podobną siłą. Ten fakt może wyjaśniać trudności w analizowaniu zależności pomiędzy strukturą a aktywnością herbicydową tej klasy związków. Niestety, bisfosfoniany wydają się być słabymi związkami wiodącymi w badaniach nad nowymi herbicydami, ponieważ bardzo trudno jest zaprojektować nowe, bardziej aktywne analogi bazując na złożonym, wieloenzymowym działaniu.

3.2 Analiza aktywności inhibitorowej bisfosfonianów względem GS metodami 3D-QSAR

Wychodząc z założenia, że dokowanie bisfosfonianów do wnęki wiążącej te herbicydy w syntetazie glutaminy nie daje wystarczająco dobrych wyników zastosowano inne podejście do próby zrozumienia podstaw aktywności inhibitorowej szeregu różnych kwasów aminometylenobisfosfonowych względem tego enzymu. Jak zaznaczono w poprzednim rozdziale trójwymiarowa struktura syntetazy glutaminy z żadnego organizmu eukariotycznego nie została do tej pory opublikowana. Dostępne są jedynie struktury enzymów bakteryjnych, które wykazują niską homologię z enzymami eukariotycznymi.



Schemat 3.1.

Korelowanie wyników analizy oddziaływań inhibitor-enzym bakteryjny z danymi biochemicznymi dla enzymów eukariotycznych nie daje więc dobrych rezultatów. Dlatego też dla zidentyfikowania cech strukturalnych analizowanych związków (Schemat 3.1) odpowiedzialnych za ich aktywność inhibitorową wybrano metodologię CoMFA/3D-QSAR.

Zminimalizowane struktury bisfosfonianów zostały nałożone na strukturę najbardziej aktywnego związku **86**. Na tak skonstruowanym zbiorze struktur przeprowadzone zostały obliczenia metodą CoMFA/3D-QSAR, przy użyciu danych eksperymentalnych zaprezentowanych w Tabeli 3.5*. Co prawda użycie małego zbioru danych eksperymentalnych nie pozwoliło otrzymać modelu w pełni oddającego korelację struktura-aktywność, można było jednak wyciągnąć kilka interesujących wniosków.

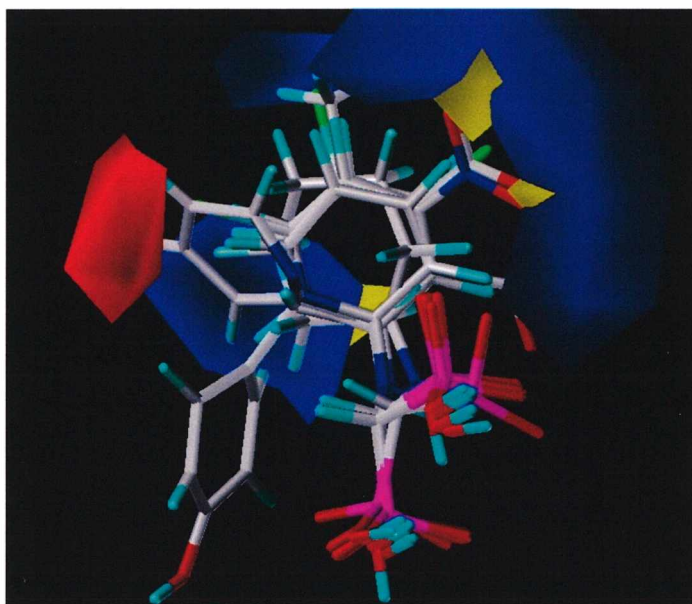
Tabela 3.5.

Wartości I_{50} (mM) dla syntetazy glutaminy z ryżu hamowanej przez kwasy aminometylenobisfosfonowe. (NA — nie aktywny)

Związek	I_{50} dla reakcji katalizowanych przez GS		
	Transferazowa	Hemi-biosyntetyczna	Biosyntetyczna
Fosfinotricyna	0.172 ± 0.014	0.049 ± 0.003	0.044 ± 0.004
72	1.04 ± 0.04	0.096 ± 0.012	0.069 ± 0.010
68	1.04 ± 0.12	0.215 ± 0.051	0.243 ± 0.033
82	1.13 ± 0.02	0.103 ± 0.011	0.064 ± 0.003
83	0.915 ± 0.047	0.461 ± 0.062	1.11 ± 0.14
84	NA	0.774 ± 0.136	0.170 ± 0.011
85	1.45 ± 0.04	0.624 ± 0.147	0.334 ± 0.020
86	0.396 ± 0.026	0.088 ± 0.015	0.033 ± 0.001
87	1.99 ± 0.22	1.62 ± 0.59	0.738 ± 0.051
88	NA	NA	1.80 ± 0.02
89	NA	0.695 ± 0.193	4.47 ± 0.27

* Prezentowane pomiary enzymatyczne zostały wykonane przez dr Agnieszkę Obojską i prof. G. Forlaniego.

Wynik analizy CoMFA/3D-QSAR przedstawia Rysunek 3.4, gdzie zaznaczone kontury reprezentują regiony, dla których zmiana cechy elektrostatycznej lub sterycznej związku korelowała ze zmianą aktywności. Niebieskie kontury wskazują miejsca, w których grupy naładowane dodatnio są korzystne, natomiast kontury czerwone to regiony, w których korzystna byłaby obecność grup naładowanych ujemnie. Podobnie, kontury zielone wskazują regiony sterycznie korzystne, podczas gdy żółte — niekorzystne. Otrzymane rezultaty pokazują, że najważniejszymi cechami, które różnicują aktywność w badanym zbiorze związków, są ich właściwości elektrostatyczne. Ważny jest zarówno rozkład ładunku w pierścieniu aromatycznym jak i na jego podstawnikach. Ujemny ładunek pierścienia aromatycznego i silnie elektroujemne podstawniki (takie jak grupa karboksylowa) wydają się być niepożądane. Jest oczywiste, że ze względu na ograniczoną przestrzeń wewnątrz aktywnej sterycznej właściwości inhibitorów są bardzo ważne, jednakże analiza tego zbioru struktur umożliwiła otrzymanie jedynie bardzo niewielkiej ilości informacji tego typu. Dwa niewielkie żółte kontury sugerują, że duże podstawniki pierścienia aromatycznego niekorzystnie wpływają na aktywność.



Rysunek 3.4.

Nalóżone struktury badanych bisfosfonianów i izopowierzchnie obliczone podczas analizy CoMFA/3D-QSAR. Izopowierzchnie wskazują regiony, gdzie wartość iloczynu $\text{StdDev} \times \text{Coef}$ wynosi 80 lub 20 procentyli.

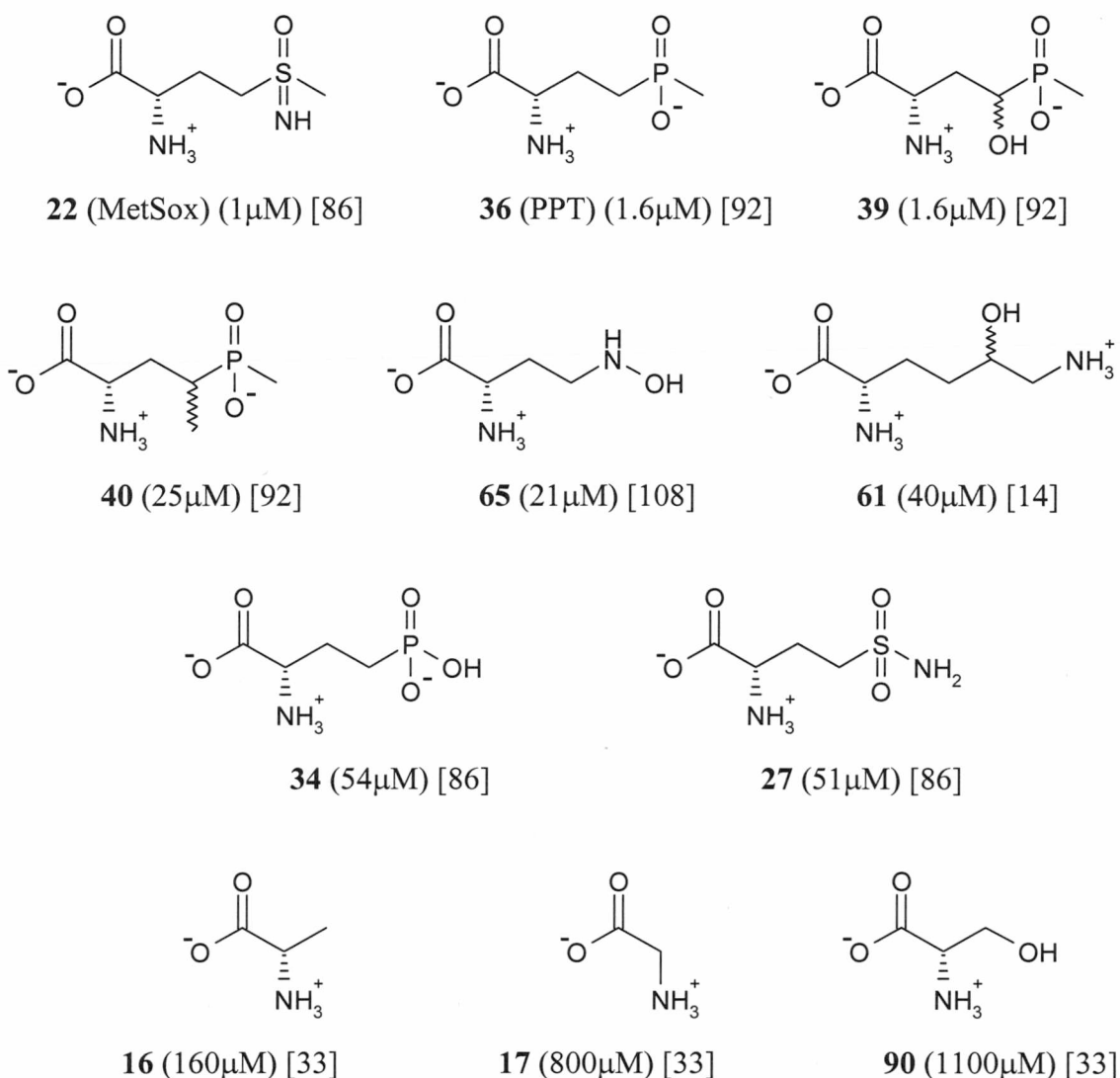
3.3. Analiza oddziaływań fosfinotricyny i jej analogów z syntetazą glutaminy

Poszukiwanie nowych inhibitorów często bazuje na komputerowo wspomaganym projektowaniu. Jakkolwiek znajomość trójwymiarowej struktury enzymu i mechanizmu reakcji enzymatycznej są najważniejsze dla dobrego projektowania nowych substancji aktywnych, sposób działania związków wiodących także musi być wzięty pod uwagę. Badania nad inhibitorami syntetazy glutaminy są prowadzone od wielu lat [14, 77, 78, 89]. Większość znanych inhibitorów jest analogami glutaminianu, wiąże się w jego miejsce w centrum aktywnym enzymu i podobnie do niego podczas reakcji enzymatycznej mogą one być fosforylowane przy udziale ATP [79, 93, 94]. Fosfinotricyna (PPT) i sulfoksyimina metioniny (MetSox) — najsilniejsze z wielu znanych inhibitorów tego enzymu są związkami wiodącymi w wielu badaniach [87, 88, 92, 95]. Trwają dyskusje na temat sposobu ich wiązania do miejsca aktywnego GS i pomimo opublikowania struktur krystalicznych kompleksów PPT-GS i MetSox-GS problem nie został do końca rozwiązany [27, 32].

W tej części pracy przeanalizowane zostały różne sposoby wiązania fosfinotricyny i sulfoksyimini metioniny do miejsca aktywnego enzymu. Nietypowy, samobójczy sposób działania większości inhibitorów syntetazy glutaminy stwarza także nowe problemy podczas komputerowo wspomaganego projektowania nowych inhibitorów. W celu zbadania tego zagadnienia grupa wybranych inhibitorów (Rysunek 3.5), analogicznie do inhibitorów wiodących, została zadokowana do centrum aktywnego enzymu zarówno w formie wolnej jak i ufosforylowanej. Następnie, wszystkie kompleksy enzym-inhibitor zostały ocenione przez 8 różnych funkcji. Dodatkowo, przeanalizowany został także rozkład ładunku na powierzchni wybranych inhibitorów w obu badanych formach.

3.3.1. Analiza sposobu działania fosfinotricyny i sulfoksyimini metioniny

Sulfoksyimina metioniny i fosfinotricyna są najlepszymi znanymi inhibitorami syntetazy glutaminy. Wiadomo, że po związaniu z enzymem zostają one ufosforylowane przy udziale ATP i w takiej formie są nieodwracalnymi inhibitorami enzymu. Analizując strukturę krystaliczną PPT-GS można stwierdzić, że w miejscu aktywnym możliwe są trzy konformacje fosfinotricyny, które otrzymano przez prostą rotację grupy metylofosfinowej [27]. Tak skonstruowano trzy struktury kompleksu PPT-GS różniące się przestrzennym ułożeniem grupy metylowej, a mianowicie takie, gdzie grupa metylowa skierowana jest w kierunku: A) Arg359, B) Glu327, C) Mn²⁺.

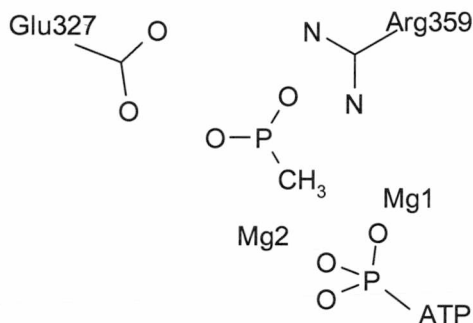


Rysunek 3.5.

Wybrane inhibitory syntetazy glutaminy i ich stałe inhibicji względem syntetazy glutaminy.

Są one nierozróżnialne za pomocą rentgenografii strukturalnej ze względu na izolektronowość grupy metylowej i atomu tlenu. Wiedząc, że w centrum aktywnym enzymu następuje ufosforylowanie atomu tlenu przy pomocy ATP i proces ten może zajść tylko przy udziale jonów metalu (n1, n2) i reszty Arg339, które polaryzują γ -fosforową grupę ATP, to konformację **C**, gdzie grupa metylowa znajduje się w pobliżu ATP, należy odrzucić (Rysunek 3.6). Istnienie dwóch pozostałych konformacji już rozważano w literaturze: wariant **A** jest analogiczny do proponowanego dla MetSox przez Liaw'a [32], a istnienie konformacji **B** sugerowane było przez Gill'a [27].*

* Obie prace pochodzą z zespołu prof. D. Eisenberga. Co ciekawsze, w pracy z roku 2001 [27] konformacja MetSox proponowana w roku 1994 [32] została zanegowana.

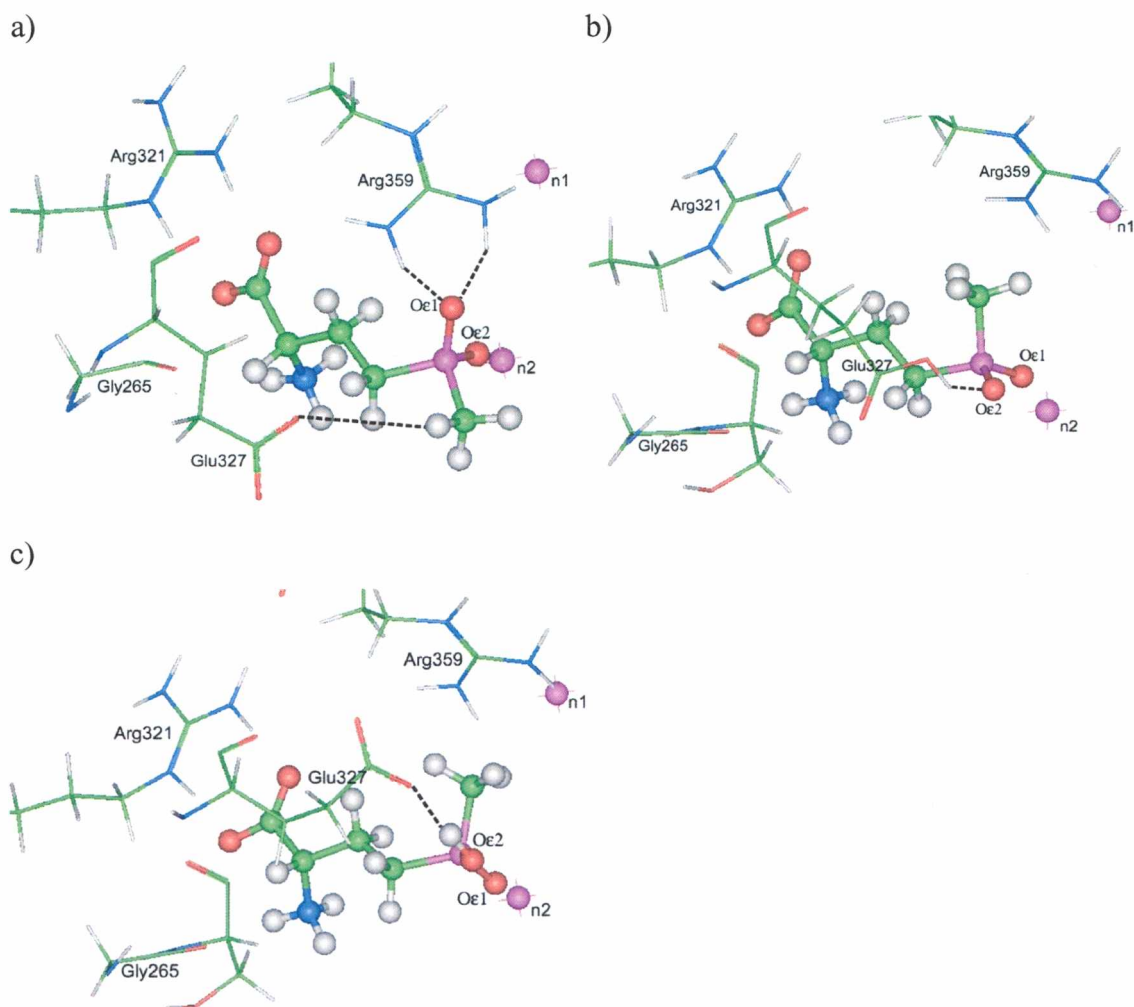


Rysunek 3.6.

Schematyczny rysunek obrazujący konformację **C** fosfinotricyny w miejscu aktywnym syntetazy glutaminy (dla czytelności rysunku pominięto atomy wodoru i resztę cząsteczki PPT).

Proponowany jest także różny sposób protonowania kwaśnych reszt karboksylowych i fosfinowych w tych dwóch konformacjach. W wariacie **A** grupa fosfinowa fosfinotricyny nie jest uprotonowana i dlatego inhibitor przypomina stan przejściowy reakcji enzymatycznej. W przypadku **B** możliwe są dwie sytuacje: uprotonowane są albo atom tlenu (Oε2) fosfinotricyny (konformacja **B1**) albo grupa β-karboksylowa reszty Glu327 (konformacja **B2**).

W celu dokładniejszej analizy proponowanych konformacji, zostały one wymodelowane w oparciu o strukturę krystaliczną kompleksu PPT-GS [27]. Pierwszym krokiem obliczeń było dodanie atomów wodoru do struktury PPT-GS i zoptymalizowanie ich pozycji. Tak otrzymano konformację **B1** (protonując fosfinotricynę) i **B2** (protonując Glu327). Konformację **A** otrzymano poprzez obrót grupy kwasu fosfinowego fosfinotricyny w konformacji **B1** i usunięcie protonu, który był do niej przyłączony. We wszystkich przypadkach następnym krokiem była pełna optymalizacja struktury centrum aktywnego. Wyniki przedstawiono na Rysunku 3.7. Pomimo, że w przypadku każdej z trzech konformacji większość oddziaływań inhibitor-enzym jest podobna, można zauważyć istotne różnice. W strukturze **A** (Rys. 3.7a) istnieje silne oddziaływanie pomiędzy ujemnie naładowanym tlenem fosfinotricyny i grupą guanidynową reszty Arg359. Dodatkowo pomiędzy grupą metylową PPT a grupą γ-karboksylową reszty Glu327 istnieje słabe wiązanie wodorowe typu C-H...O. W strukturach **B1** i **B2** (Rys. 3.7b i c) obserwujemy jedynie wiązanie wodorowe typu OH...O pomiędzy resztą Glu327 a atomem tlenu (Oε2) fosfinotricyny.



Rysunek 3.7.

Zoptymalizowane struktury kompleksu PPT-GS dla trzech różnych konformacji PPT w miejscu aktywnym: a) **A**; b) **B1**; c) **B2**.

W celu ilościowego oszacowania oddziaływań enzym-inhibitor, zarówno struktury ze zminimalizowanymi położeniami atomów wodoru jak i te w pełni zoptymalizowane zostały ocenione przez funkcje z programu LUDI [162-164]. Wyniki obliczeń przedstawione w Tabeli 3.6 jasno pokazują, że konformacja **A** jest znacznie korzystniejsza niż **B1** lub **B2**. Różnica 200 - 300 punktów w ocenie sumarycznej (LUDI_1) jest znacznie większa niż błąd metody (ok. 100 punktów). Najistotniejsze różnice w ocenie wiązania są spowodowane przez oddziaływania z trzema grupami: Arg359, Glu327, n2, co jest zobrazowane wynikami funkcji oceniającej oddziaływania inhibitora z poszczególnymi resztami (odpowiednio SCORE_ARG, SCORE_GLU, SCORE_N2). Wartości te wykazują, że konformacja **A** jest korzystniejsza dzięki bardzo silnym oddziaływaniom pomiędzy resztą Arg359 i atomem Oe1 fosfinotricyny.

Tabela 3.6.

Wartości funkcji oceniającej LUDI_1 dla kompleksów PPT-GS w różnych konformacjach i dla różnych opcji optymalizacji ('H' — optymalizacja atomów wodoru, 'pełna' — pełna optymalizacja inhibitora i reszt miejsca aktywnego)

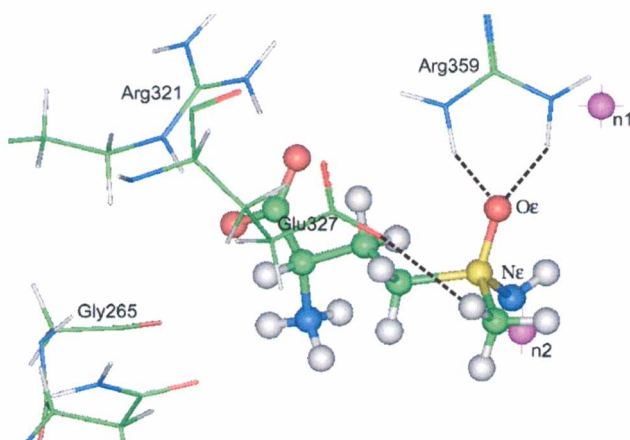
Konformacja PPT	Optymalizacja	LUDI_1	SCORE_ARG	SCORE_GLU	SCORE_N2
A	H	783	68	0	145
	pełna	1005	229	0	94
B1	H	625	0	51	32
	pełna	727	0	53	113
B2	H	562	0	0	18
	pełna	810	0	83	83

Są one silniejsze niż obserwowane pomiędzy grupą γ -karboksylową Glu327 a atomem O ϵ 2 fosfinotricyny w strukturach **B1** i **B2**. Jakkolwiek oszacowanie wkładu wiązania typu C-H $\cdots$ O nie jest możliwe przy użyciu prostej funkcji z programu LUDI, musi ono być wzięte pod uwagę przy analizowaniu struktury **A**. Wiązanie wodorowe łączące grupę γ -karboksylową Glu327 i grupę metylową PPT jest kluczowe dla stabilności kompleksu inhibitor-GS. Najprawdopodobniej, to wiązanie stabilizuje pętlę Glu327, która blokuje wejście do miejsca aktywnego i powoduje, że inhibitor po fosforylacji pozostaje nieodwracalnie związany. Choć obecność wiązań wodorowych typu C-H $\cdots$ O jest raczej rzadko rozważana w analizie kompleksów inhibitor-enzym, takie oddziaływanie było już obserwowane w podobnym układzie — centrum aktywnym astacyny [168].

Innym czynnikiem, który musi być rozważony podczas analizy poprawności diskutowanych struktur są stałe protonacji grupy γ -karboksylowej reszty Glu327 i grupy kwasu fosfinowego fosfinotricyny. Wiadomo, że w roztworze o pH fizjologicznym grupa γ -karboksylowa reszt glutaminianowych nie jest uprotonowana. Co więcej badając mechanizm reakcji enzymatycznej udowodniono, że w wolnym enzymie grupa γ -karboksylowa Glu327 występuje także w formie zjonizowanej. Pomiaru stałych protonacji dla PPT wykazały, że pK_a kwasu fosfinowego jest mniejsza

niż 2 [169]. Ta wartość udowadnia, że grupa ta nie może być uprotonowana w roztworze o pH fizjologicznym. Te stosunkowo proste rozważania dodatkowo podkreślają znacznie większe prawdopodobieństwo poprawności struktury **A**.

Pomiary biochemiczne wykazują, że mechanizm działania sulfoksyiminy metioniny jest analogiczny do obserwowanego w przypadku fosfinotricyny. Struktura krystaliczna kompleksu MetSox-GS pokazuje, że sposób wiązania tego inhibitora jest również podobny do wiązania PPT. Konformację sulfoksyiminy metioniny związanej do miejsca aktywnego można wydedukować z dostępnych danych biochemicznych. Po pierwsze, po związaniu inhibitora do enzymu fosforylowany jest atom azotu Ne, a proces fosforylacji jest katalizowany przez dwa jony metalu (n1, n2) i resztę Arg339, które polaryzują γ -fosforanową grupę ATP. Te fakty udowadniają, że atom azotu grupy sulfoksyiminowej MetSox musi znajdować się w pobliżu jonu metalu n2. Po drugie, stwierdzono, że jedynie diastereoizomer (R,S) sulfoksyiminy metioniny hamuje aktywność syntetazy glutaminy, co definiuje położenie pozostałych podstawników atomu siarki i konformację całej cząsteczki.



Rysunek 3.8.

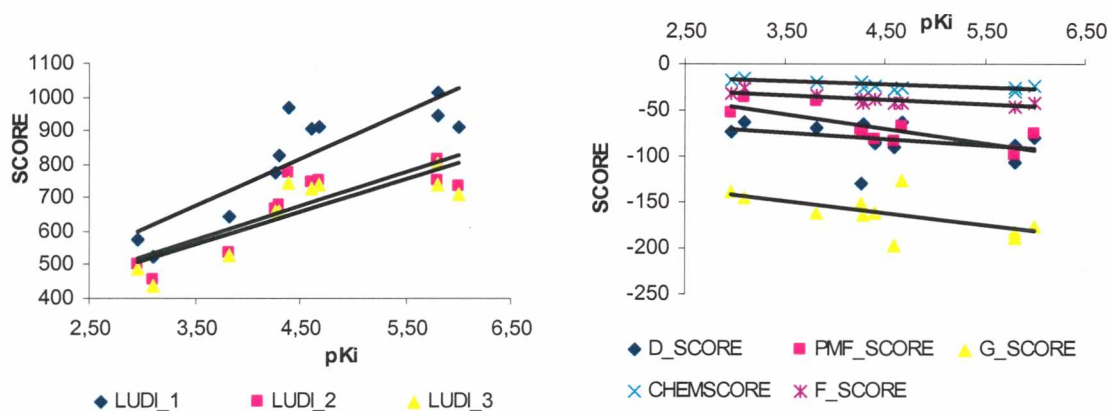
Zoptymalizowana struktura kompleksu MetSox-GS.

Biorąc pod uwagę wszystkie wyżej opisane spostrzeżenia wymodelowano strukturę kompleksu MetSox-GS. Zminimalizowana struktura przedstawiona została na Rysunku 3.8. Zarówno położenie atomu tlenu O ϵ , jak i grupy metylowej jest analogiczne jak w strukturze **A** kompleksu PPT-GS. Ten fakt powoduje, że oddziaływania enzym-inhibitor w obydwóch kompleksach są podobne, a ich ocena przy pomocy funkcji z programu LUDI daje zbliżone wartości. To koreluje ze zbliżonymi

wartościami stałych inhibicji MetSox i PPT i dodatkowo popiera poprawność tezy, że fosfinotricyna w miejscu aktywnym GS przyjmuje konformację A.

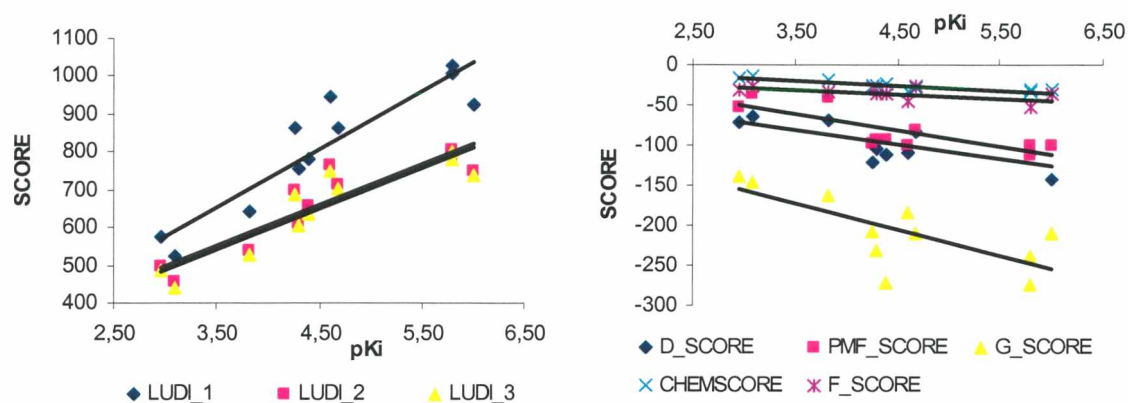
3.3.2 Analiza zależności wyniku funkcji oceniającej od stałej inhibicji dla wybranych inhibitorów

Na podstawie otrzymanych struktur kompleksów fosfinotricyny i sulfoksyiminy metioniny z syntetazą glutaminy, pozostałe z wybranych inhibitorów (związki **16**, **17**, **27**, **34**, **39**, **40**, **61**, **65**, **90**) zostały zadokowane do miejsca aktywnego enzymu. W przypadku związków **16**, **17**, **90** zaproponowany sposób wiązania był zgodny ze strukturami krystalicznymi kompleksów enzym-inhibitor o niskiej rozdzielczości [33]. Położenie reszt aminokwasowych należących do centrum aktywnego enzymu i inhibitora zoptymalizowano. Tak otrzymane kompleksy oceniono za pomocą funkcji z programu LUDI z pakietu Insight [170] (LUDI_1, LUDI_2 i LUDI_3) oraz z programu Sybyl [171] (D_SCORE, PMF_SCORE, G_SCORE, CHEMScore, F_SCORE). Zależności pomiędzy wynikiem funkcji oceniającej a ujemnym logarytmem z eksperymentalnej stałej inhibicji (pK_i) zostały przedstawione na Rysunku 3.9. Dla większości funkcji oceniających korelacja tych wartości jest dobra. Jedynie funkcje D_SCORE i G_SCORE dają gorsze rezultaty.



Rysunek 3.9.

Zależności pomiędzy wynikami różnych funkcji oceniających struktury inhibitor-enzym a wartościami eksperymentalnymi pK_i .



Rysunek 3.10.

Zależności pomiędzy wynikami różnych funkcji oceniania struktury ufosforylowanych inhibitorów-enzymu a wartościami eksperymentalnymi pK_i .

Na podstawie znaczącej analogii strukturalnej związków **27**, **34**, **39**, **40**, **61**, **65** do fosfinotricyny i sulfoksyminy metioniny można założyć, że są one fosforylowane w miejscu aktywnym syntetazy glutaminy. Ufosforylowane formy tych związków są więc najprawdopodobniej właściwymi inhibitorami tego enzymu. Dodatkowo przeanalizowano więc struktury kompleksów tak zmodyfikowanych inhibitorów z enzymem. Struktury te zostały otrzymane poprzez modyfikację inhibitorów zadokowanych w miejscu aktywnym i optymalizację nowo otrzymanego kompleksu.

Serię nowych struktur oceniono tym samym zestawem funkcji oceniania, jaki był użyty w poprzednim przypadku. Wyniki funkcji oceniania i eksperymentalnej stałej inhibicji wykazują znaczącą korelację (Rysunek 3.10). Zestawienie współczynników R^2 dla tych korelacji dla serii struktur nieufosforylowanych i ufosforylowanych inhibitorów przedstawiono w Tabeli 3.7. W obu przypadkach wartości R^2 wskazują, że większość funkcji oceniania daje dobre wyniki. Jednakże dla serii inhibitorów ufosforylowanych obserwowano lepszą korelację wyników i średnia wartość R^2 dla tej serii była większa. Znacząca korelacja pomiędzy wynikiem funkcji oceniania a danymi eksperymentalnymi potwierdza poprawność zaproponowanych struktur. Co więcej, wynik ten sugeruje, że rozważanie inhibitorów ufosforylowanych jest poprawniejsze i taki sposób analizy może być pomocny w projektowaniu nowych potencjalnych inhibitorów syntetazy glutaminy.

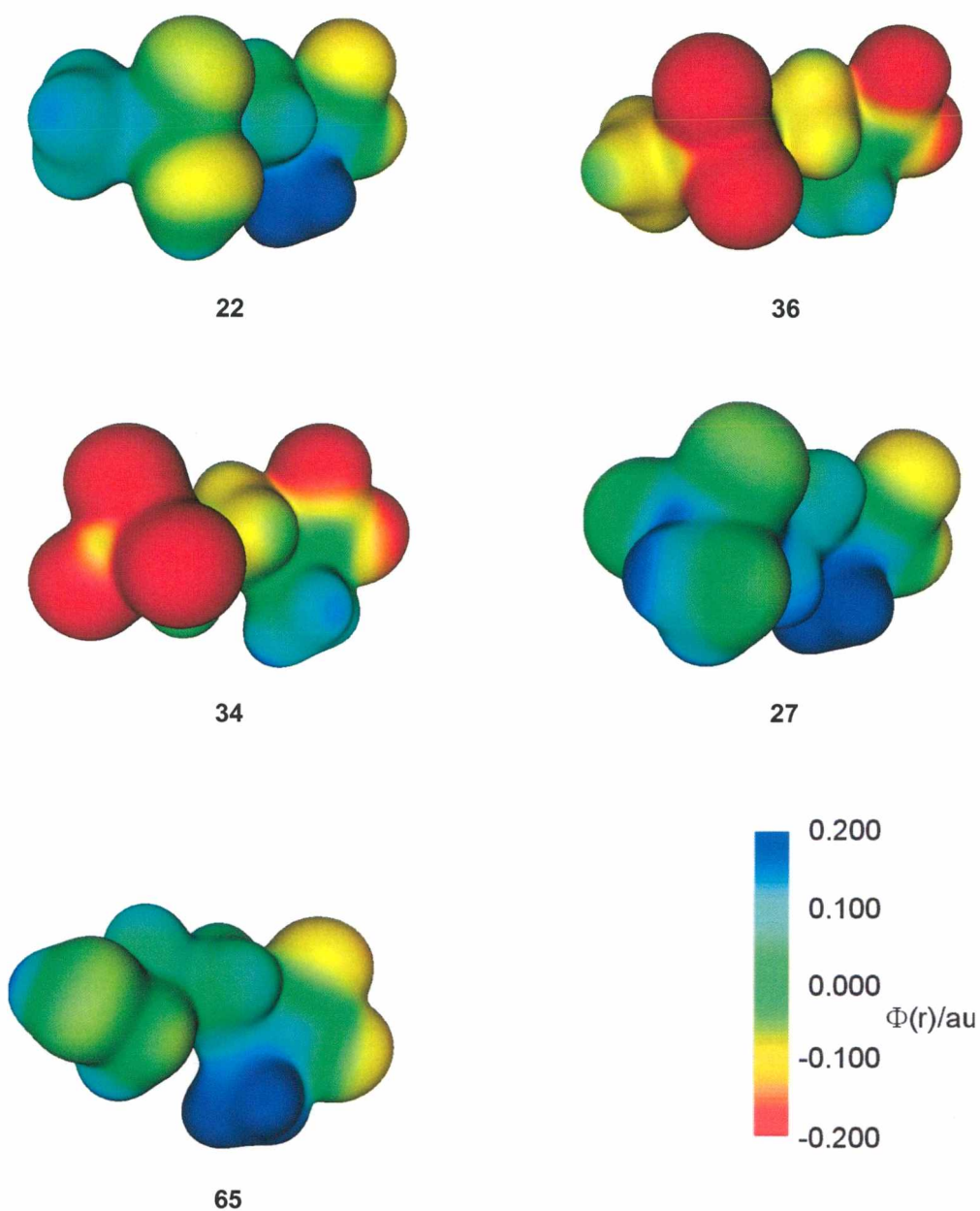
Tabela 3.7.

Współczynniki korelacji R^2 dla zależności wyników funkcji oceniającej od eksperymentalnej stałej inhibicji dla różnych funkcji i dwóch serii związków (formy nieufosforylowane i ufosforylowane).

Funkcja oceniająca	Współczynnik korelacji R^2 dla serii inhibitorów	
	nieufosforylowanych	ufosforylowanych
LUDI_1	0.74	0.84
LUDI_2	0.72	0.83
LUDI_3	0.72	0.84
D_SCORE	0.12	0.60
PMF_SCORE	0.66	0.66
G_SCORE	0.39	0.52
CHEM_SCORE	0.68	0.78
F_SCORE	0.79	0.42
Średnia	0.60	0.68

3.3.3. Analiza struktury elektronowej wybranych analogów fosfinotricyny

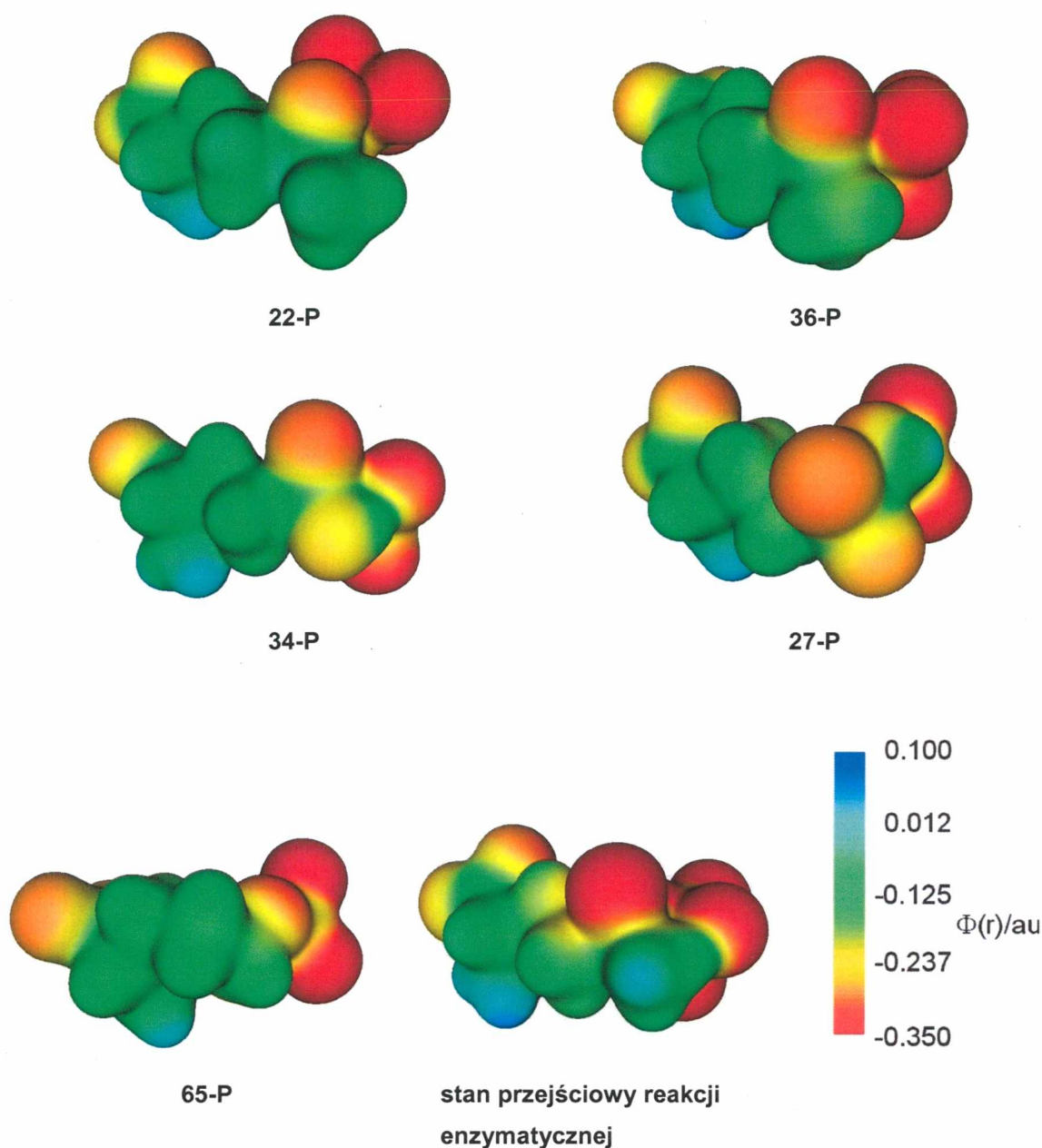
W celu szczegółowej analizy istotnych cech struktury elektronowej inhibitorów syntetazy glutaminy wybrano związki o podobnej strukturze przestrzennej, ale różnych stałych inhibicji (związki **22**, **36**, **65**, **34**, **27**). Dla każdego z nich policzono przy użyciu metod *ab initio* rozkład potencjału elektrostatycznego na powierzchni o jednakowej gęstości elektronowej (Rysunek 3.11). Część cząsteczki, która jest identyczna z cząsteczką glutaminianu, ma bardzo podobną strukturę elektronową we wszystkich badanych przypadkach. Natomiast kluczowy wydaje się być rozkład potencjału elektrostatycznego na fragmencie inhibitora, który w centrum aktywnym enzymu zajmuje miejsce grupy γ -karboksylowej glutaminianu. Struktura elektronowa tego fragmentu jest bowiem bardzo podobna w przypadku najaktywniejszych związków **22** i **36** — dwa atomy mają potencjał ujemny, natomiast jedna grupa jest neutralna. Ponieważ są one najlepszymi znanymi inhibitorami syntetazy glutaminy, taki rozkład potencjału można uznać za optymalny.



Rysunek 3.11.

Rozkład potencjału elektrostatycznego $\Phi(r)$ na izopowierzchniach gęstości elektronowej dla wybranych inhibitorów.

Analiza ufosforylowanych form inhibitorów wydaje się być bardziej właściwa, tak więc został policzony również rozkład potencjał elektrostatycznego na powierzchni tych związków (Rysunek 3.12). Ponownie, związki **22** i **36** w formie ufosforylowanej (odpowiednio **22-P** i **36-P**) mają bardzo podobny rozkład potencjału.



Rysunek 3.12.

Rozkład potencjału elektrostatycznego $\Phi(r)$ na izopowierzchniach gęstości elektronowej dla wybranych inhibitorów w formie ufosforylowanej i stanu przejściowego reakcji enzymatycznej.

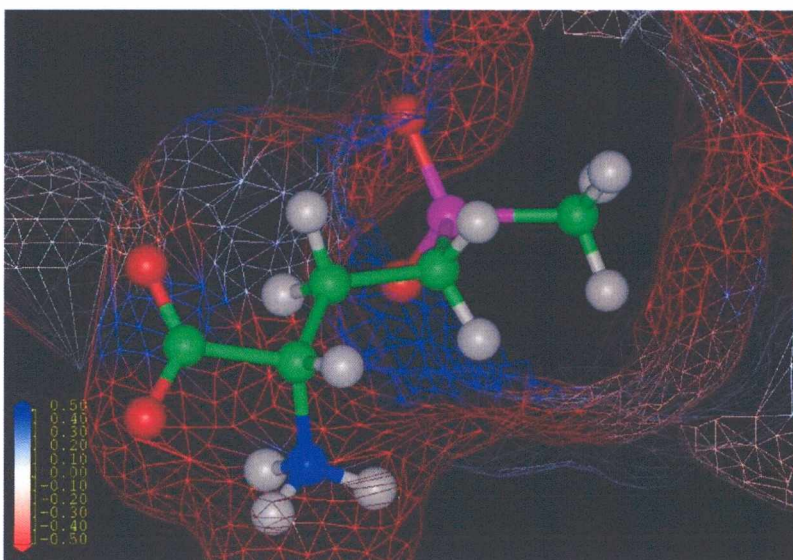
Porównanie ich rozkładu potencjału elektrostatycznego z analogami **65-P**, **34-P** i **27-P** prowadzi do stwierdzenia, że ważne są dwie cechy: ujemny potencjał na atomie umieszczonym w miejscu atomu Oe2 cząsteczki PPT oraz brak ujemnego potencjału w pozycji, którą zajmuje grupa metylowa związków **22** i **36**. Związek **65** nie spełnia pierwszego postulatu, natomiast związki **34** i **27** drugiego. Ostatecznie te trzy związki wykazują podobną, ale mniejszą niż fosfinotricyna aktywność inhibitorową.

Dodatkowo obliczony został także rozkład potencjału elektrostatycznego na powierzchni stanu przejściowego reakcji enzymatycznej. Znaczące podobieństwo tego rozkładu ze strukturami elektronowymi **22-P** i **36-P** wskazuje, że badane związki mogą być uważane za analogi stanu przejściowego tej reakcji. Fakt ten dodatkowo potwierdza poprawność propozycji wiązania PPT w konformacji **A**. Fosforylacja PPT w konformacji **A** we wnętrzu katalitycznej enzymu daje diastereoizomer (R,R), podczas gdy w przypadku konformacji **B1** lub **B2** powstawałby diastereoizomer (R,S). Tylko pierwszy z nich (przedstawiony na rysunku) jest podobny do stanu przejściowego reakcji enzymatycznej.

3.4. Projektowanie analogów fosfinotricyny

W tej części pracy jako substancję wiodącą wybrano fosfinotricynę. Związek ten ma kilka zalet, które uzasadniają taki wybór. Po pierwsze, jest to jeden z najsilniejszych inhibitorów syntetazy glutaminy. Po drugie, struktura tego inhibitora jest stosunkowo prosta i po trzecie, znana jest struktura krystaliczna kompleksu fosfinotricyna-syntetaza glutaminy [27]. Szczegółowa analiza tego kompleksu (przedstawiona w poprzednim rozdziale) pozwala na dokładne zdefiniowanie konformacji inhibitora w centrum aktywnym enzymu.

Jako najbardziej prawdopodobną do celów projektowania wybrano strukturę kompleksu w konformacji **A**. Wstępna analiza tego kompleksu pozwala przypuszczać, że możliwe jest dodanie nowych grup funkcyjnych do fosfinotricyny tak, aby energia jej oddziaływania z enzymem wzrosła. Jest to warunkowane przez wolną przestrzeń w kieszeni enzymu wiążącej inhibitor (Rysunek 3.13). Po zamknięciu pętli wiążącej Glu327 (nie przedstawionej na rysunku) znaczna część cząsteczki fosfinotricyny jest ściśle dopasowana do enzymu, pozostawiając niewiele przestrzeni na dodatkowe grupy projektowanego analogu. Pozostają jednakże pewne możliwości, z których najciekawsza wydaje się być wnęka wiążąca jon amonowy składająca się z reszt aminokwasowych: Asp50', Ser53', Tyr179, Glu212 (na rysunku po prawej stronie grupy metylowej PPT). Reszty te są naładowane ujemnie, co powoduje, że będą silnie oddziaływać z dodatnio naładowaną grupą.

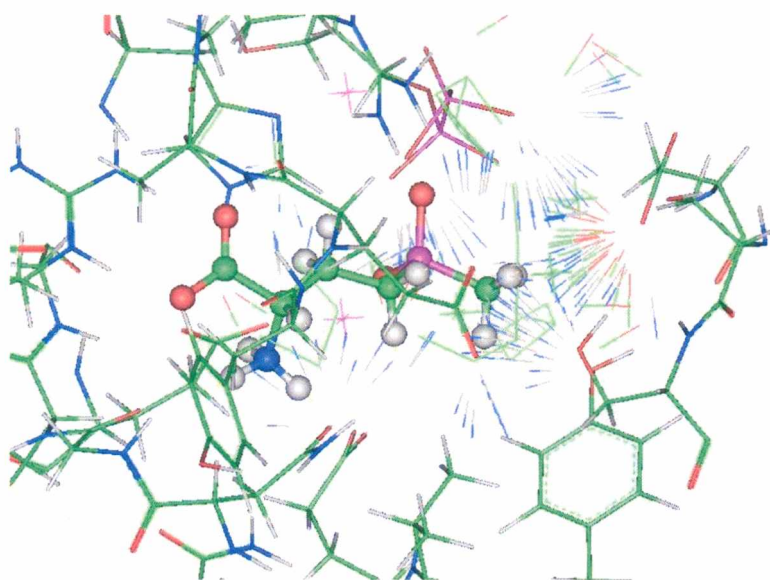


Rysunek 3.13.

Struktura kompleksu fosfinotricyna-syntetaza glutaminy użyta do projektowania nowych analogów fosfinotricyny. Na rysunku przedstawiono powierzchnię miejsca aktywnego (pokolorowaną wg rozkładu ładunku) i inhibitor.

Wnęka wiążąca jon amonowy jest stosunkowo niewielka — poza grupą metylową fosfinotricyny, może zmieścić się tu jedynie jeden dodatkowy atom ciężki. Większa przestrzeń — dająca możliwość zaprojektowania bardziej rozbudowanych podstawników, otwiera się w korytarzu prowadzącym do kieszeni wiążącej ATP (na rysunku za grupą metylową PPT).

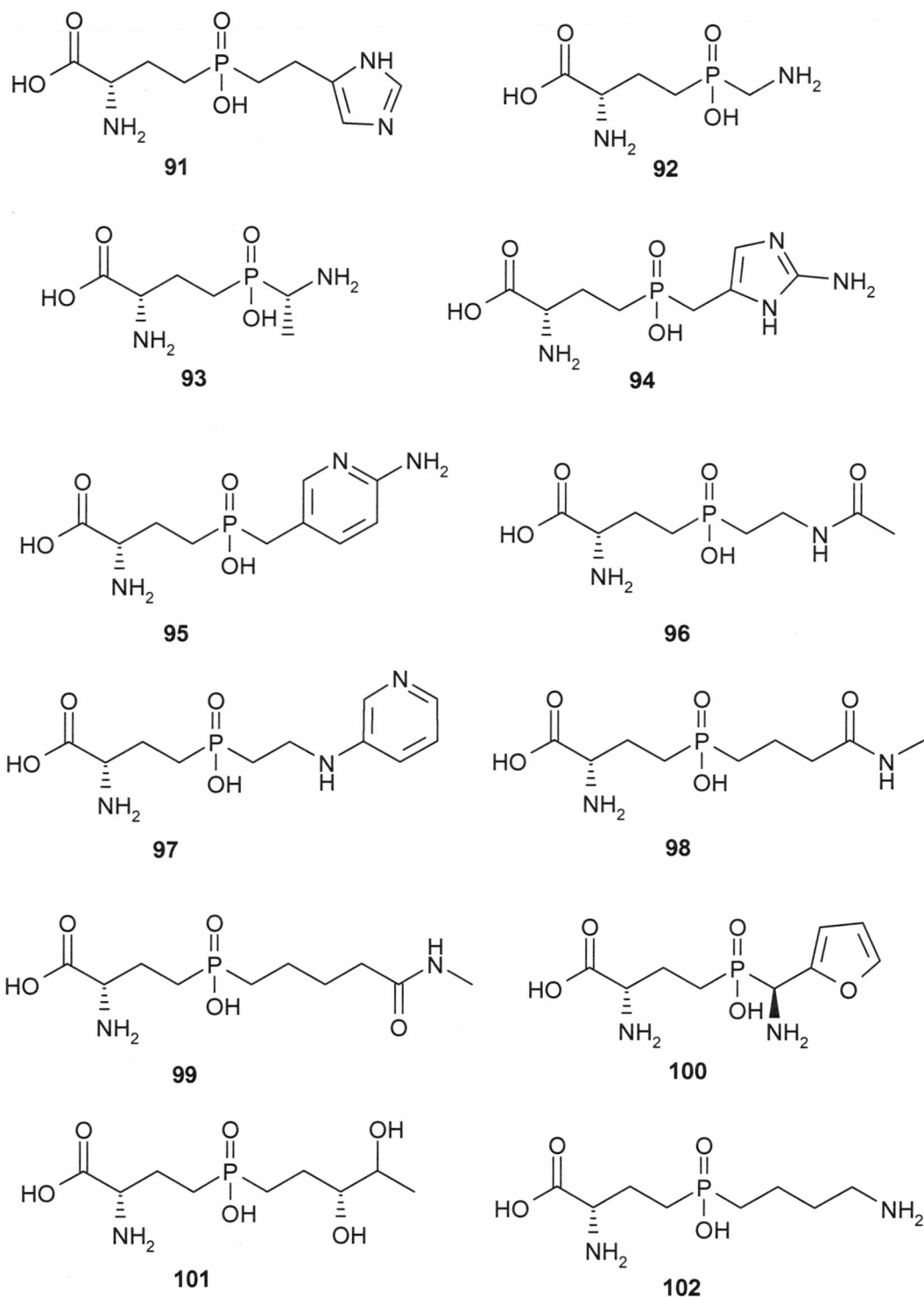
Do zaprojektowania nowych potencjalnych inhibitorów syntetazy glutaminy użyto programu LUDI z pakietu Insight 2000 [170]. W pierwszym kroku obliczeń program ten wykrywa potencjalne miejsca oddziaływania konstruowanego inhibitora z enzymem. Mogą to być oddziaływania typu wiązań wodorowych lub lipofilowe. Możliwość tworzenia nowego potencjalnego wiązania wodorowego jest próbkowana przez umieszczenie grupy karbonylowej (akceptor wiązania wodorowego) lub grupy N-H (donor wiązania wodorowego) (Rysunek 3.14). Możliwe oddziaływania typu lipofilowego są określane przez umieszczenie łańcuchów atomów węgla. Z rysunku obrazującego potencjalne oddziaływania łatwo odczytać, że w centrum aktywnym enzymu są możliwe różnorodne interakcje pomiędzy enzymem a nowym inhibitorem. Szczególnie wiele potencjalnych wiązań wodorowych jest w pobliżu miejsca wiązania jonu amonowego. W korytarzu prowadzącym do wnęki wiążącej ATP są możliwe oddziaływania zarówno lipofilowe jak i wiązania wodorowe.



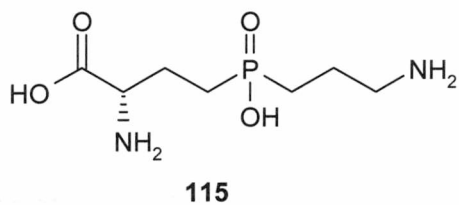
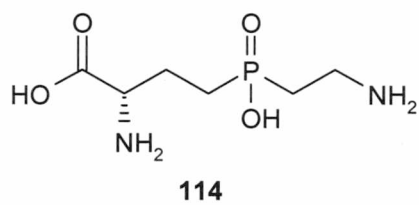
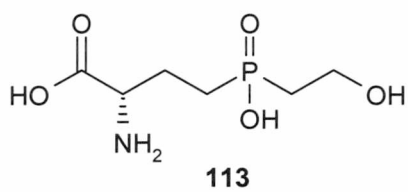
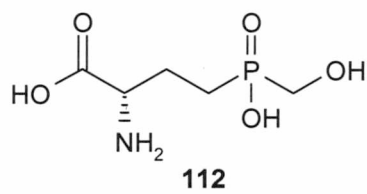
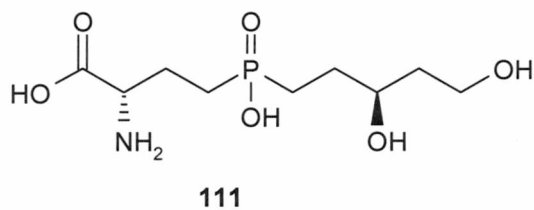
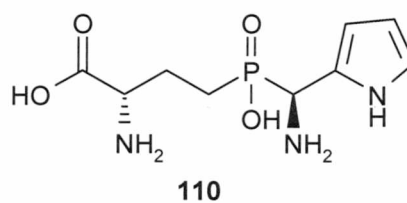
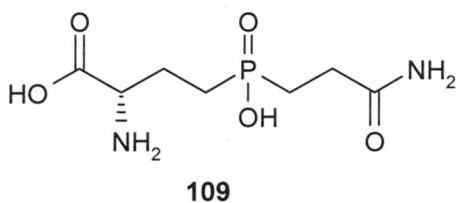
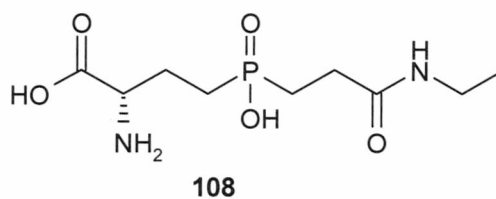
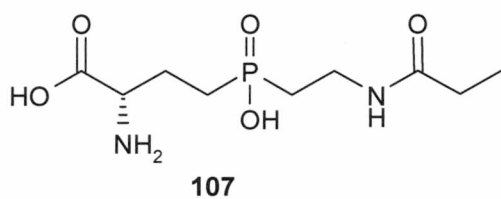
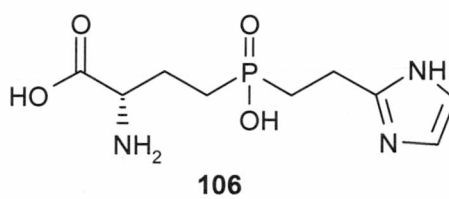
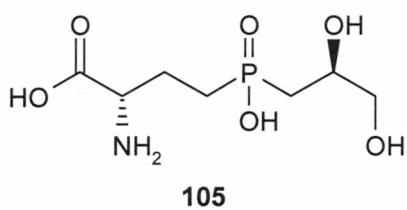
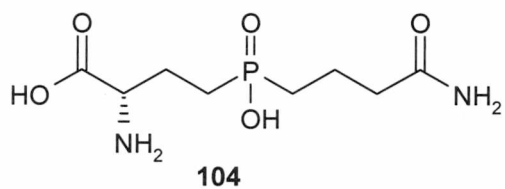
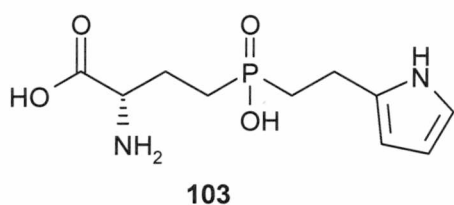
Rysunek 3.14.

Potencjalne miejsca oddziaływań typu wiązanie wodorowe (zaznaczone jako grupy C=O lub N-H) i lipofilowego (zaznaczone jako łańcuchy atomów węgla) nowych inhibitorów z centrum aktywnym syntetazy glutaminy.

Program LUDI zastosowano w trybie modyfikowania znanego inhibitora (*Link mode*). Otrzymano szereg różnorodnych struktur (Schemat 3.2, związki uszeregowano od najbardziej do najmniej aktywnego), jednak we wszystkich analogach dodatkowa grupa została przyłączona do podstawnika metylowego, co wynikało z dostępności wolnej przestrzeni w miejscu aktywnym syntetazy glutaminy.



Schemat 3.2.



Schemat 3.2.cd

Aby zaprojektowane struktury kompleksów inhibitor-enzym były optymalne, zostały one zminimalizowane przy pomocy pola siłowego cff97 [172]. Ocena tych struktur przy użyciu funkcji LUDI_1 była przeprowadzona zarówno przed jak i po minimalizacji (Tabela 3.8). Struktury, których ocena ogólna (LUDI_1) po optymalizacji była niższa niż 977 punktów (tj. ocena dla fosfinotricyny minus 60), zostały arbitralnie odrzucone. Jest to uzasadnione bardzo niewielką szansą uzyskania wyższej aktywności od inhibitora wiodącego (przy uwzględnieniu błędu metody około 100). Z drugiej strony otrzymano też kilka struktur o bardzo wysokiej wartości funkcji LUDI_1, co daje duże prawdopodobieństwo skonstruowania inhibitora lepszego od fosfinotricyny.

Tabela 3.8.

Zestawienie wartości funkcji oceniającej LUDI_1 dla zaprojektowanych potencjalnych inhibitorów syntetazy glutaminy

Ocena struktury otrzymanej przy pomocy programu LUDI					
Ocena struktury zoptymalizowanej					
Związek	LUDI_1	HB_SCORE	LIPO_SCORE	IONIC_SCORE	
PPT	1037	0	239	995	
91	1144	27	361	1029	
	1271	152	364	1028	
92	1169	155	216	995	
	1260	53	227	1202	
93	1201	155	248	995	
	1248	73	257	1140	
94	1250	151	301	995	
	1243	351	310	830	
95	1323	0	375	1196	
	1212	21	399	1040	
96	1251	83	370	995	
	1205	225	375	878	
97	1196	48	426	995	
	1186	161	435	863	
98	1189	122	370	995	
	1147	96	372	977	
99	1226	80	399	995	
	1145	286	446	737	
100	1293	155	340	995	
	1142	83	310	997	
101	1062	25	340	995	
	1118	269	358	789	

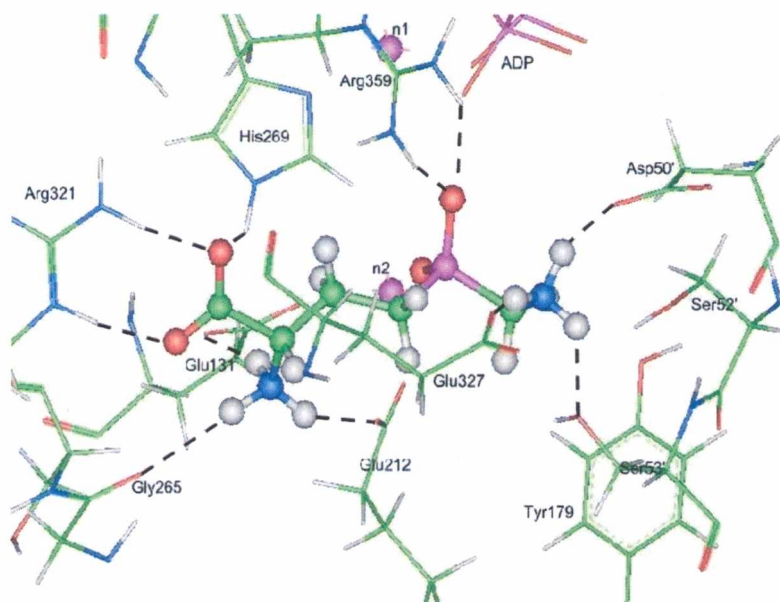
Tabela 3.8. cd.

Związek	LUDI_1	HB_SCORE	LIPO_SCORE	IONIC_SCORE
102	1090	74	319	995
	1117	28	310	1077
103	1161	46	393	995
	1102	138	405	832
104	1165	161	307	995
	1101	331	304	764
105	1080	83	275	995
	1086	202	313	844
106	1222	144	384	995
	1074	83	387	902
107	1091	13	381	995
	1073	170	423	778
108	1175	15	387	995
	1047	134	396	815
109	1100	15	287	995
	1043	187	272	857
110	1293	155	340	995
	1040	166	301	821
111	1064	71	296	995
	1031	228	310	791
112	1064	69	222	995
	1018	120	213	908
113	1037	0	239	995
	1003	129	272	850
114	1051	50	254	995
	986	21	296	917
115	1118	0	296	1095
	977	99	307	844

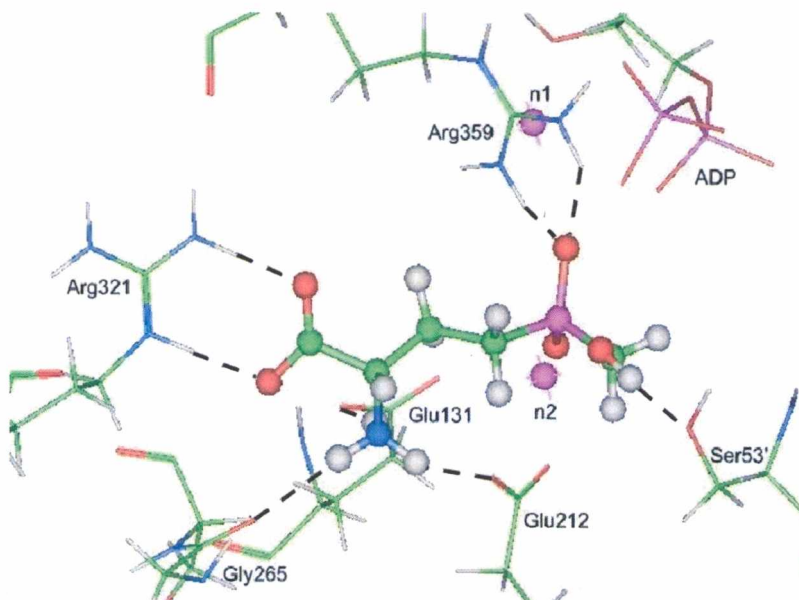
Obliczone zostały również oceny poszczególnych typów oddziaływań: wiązania wodorowe (HB_SCORE), lipofilowe (LIPO_SCORE) i jonowe (IONIC_SCORE). Z analizy wartości tych składowych wynika, że najważniejsze są oddziaływania jonowe. Wartość funkcji IONIC_SCORE jest 2-3 razy większa niż LIPO_SCORE i wielokrotnie większa niż HB_SCORE. Co więcej, dla większości przypadków IONIC_SCORE jest skorelowana z oceną ogólną LUDI_1 — dla inhibitorów o wysokiej wartości LUDI_1 znacząca jest także wartość IONIC_SCORE. Taki rozkład oddziaływań wydaje się być zgodny ze schematem reakcji enzymatycznej. Projektowane inhibitory zajmują miejsce, gdzie wiązane są glutaminian i jon amonowy, które silnie elektrostatycznie oddziałują z enzymem.

Analiza otrzymanych struktur pozwala wskazać istotne motywy strukturalne, które są wspólne dla wielu związków. Najciekawszym i pod względem ekonomii atomowej najwydajniejszym wydaje się być podstawnik $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ w związku **92**. Struktura kompleksu tego analogu z syntetazą glutaminy (Rysunek 3.15.a) wyjaśnia tak wysoką wartość funkcji LUDI_1.

a)

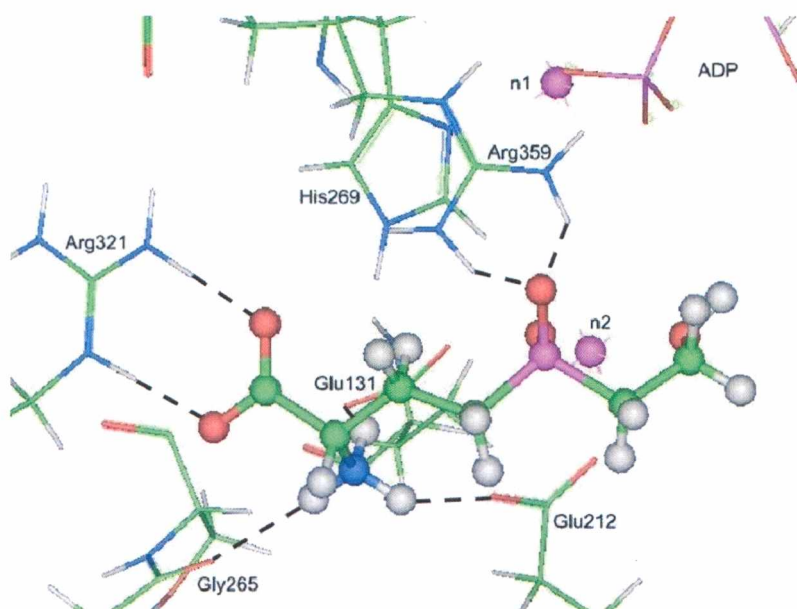


b)



Rysunek 3.15.

c)



Rysunek 3.15. cd.

Zoptymalizowane struktury kompleksów syntetazy glutaminy i zaprojektowanych inhibitorów: a) **92**, b) **112**, c) **113**.

Grupa aminowa związku **92** została zadokowana w miejscu wiązania jonu amonowego i ze względu na bliską analogię strukturalną tych dwóch indywiduów ich oddziaływania z enzymem są podobne — przez reszty aminokwasowe Asp50', Ser53' i Glu327. Analogicznie do związku **92** wiążą się z enzymem struktury z fragmentem $-\text{CH}(\text{R})\text{NH}_2$, czyli związki **93**, **100**, **110**.

Podobnym do CH_2NH_2 fragmentem strukturalnym jest grupa $-\text{CH}_2\text{OH}$ (związek **112**, Rysunek 3.15.b). Fragment ten także oddziałuje z wnęką wiążącą jon amonowy, jednakże w tym przypadku wiązanie nie jest tak optymalne. Grupa $-\text{OH}$ może utworzyć jedynie jedno wiązanie wodorowe, co przekłada się na dużo niższą ocenę ogólną LUDI_1.

Kolejnym fragmentem, który można odnaleźć w wielu zaprojektowanych analogach jest $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{R}$. Struktura kompleksu związku **113** (gdzie grupą tą jest $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) z syntetazą glutaminy (Rysunek 3.15.c) pokazuje istotne oddziaływania tej części cząsteczki. Kluczowym jest w tym przypadku elektrostatyczne przyciąganie dodatnio naładowanego jonu metalu n2 i atomu tlenu inhibitora.

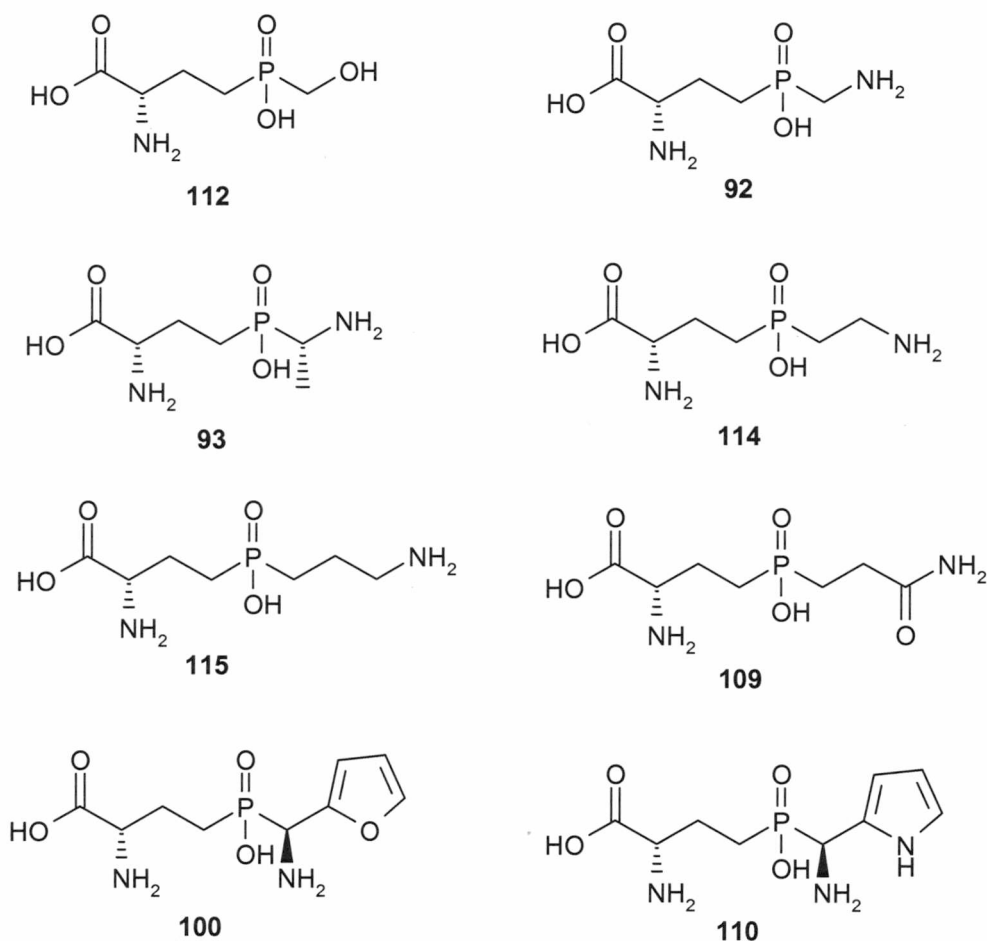
W przypadku związków z podstawnikami o większej objętości (np. **91**, **94**, **97**), nowo dodane fragmenty zostały zadokowane w korytarzu prowadzącym do wnęki wiążącej ATP. Przestrzeń dostępna w tej kieszeni jest stosunkowo duża a możliwości

tworzenia wiązań wodorowych wielorakie. To powoduje, że nie zaobserwowano jednolitego sposobu wiązania podstawników zadokowanych w tej części enzymu.

3.5. Synteza pochodnych fosfinotricyny

3.5.1. Analiza retrosyntetyczna

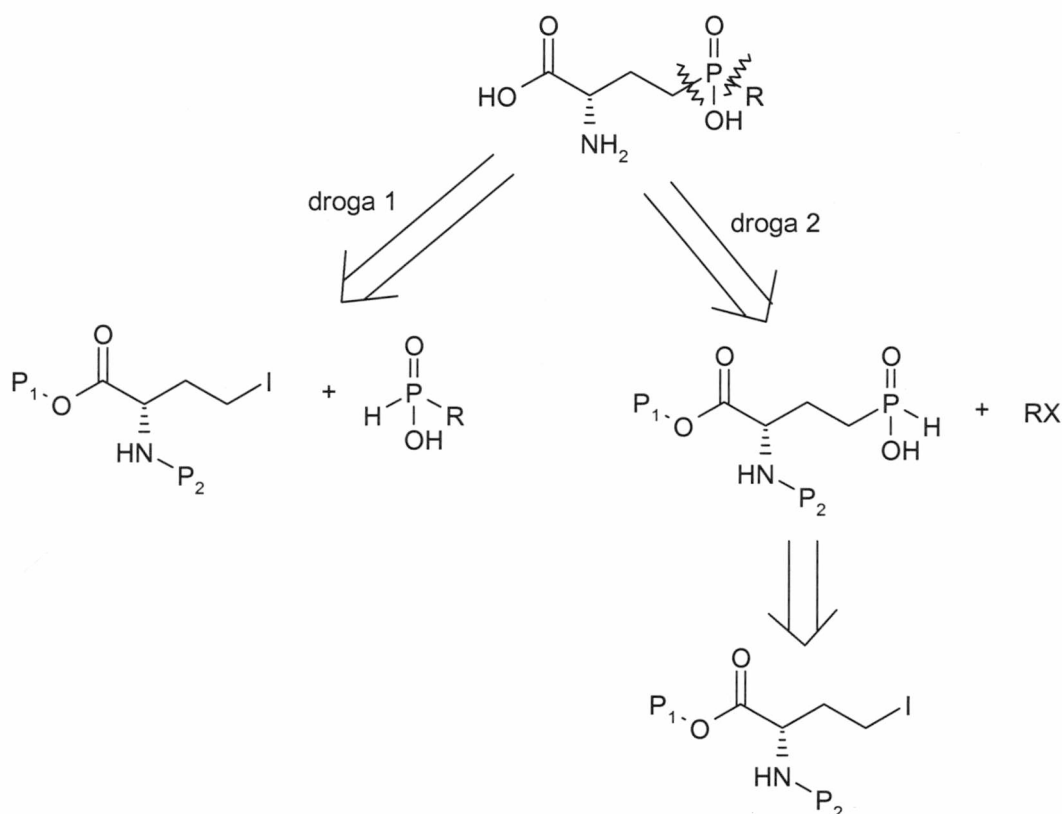
W kolejnym etapie pracy, spośród wielu zaprojektowanych, potencjalnych inhibitorów syntetazy glutaminy, zostały wybrane te, które wydawały się być dostępne na drodze syntezy. Struktury wybranych związków przedstawiono na Schemacie 3.3. Znaczna część tych związków jest bardzo prostymi analogami fosfinotricyny.



Schemat 3.3.

Ich synteza w formie enancjomerycznie czystej wymagała analizy retrosyntetycznej (Schemat 3.4). Sensowne wydają się być dwa rozłączenia w strukturze produktu: po prawej lub lewej stronie atomu fosforu. W przypadku pierwszym (droga 1) otrzymujemy jako potencjalne substraty kwas alkanofosfinowy i kwas α -amino- γ -jodomasłowy (oba związki z zabezpieczonymi funkcjami, które nie biorą udziału w reakcji tworzenia wiązania fosfor-węgiel). Droga 2 również prowadzi

do odpowiednio zabezpieczonego kwasu α -amino- γ -jodomasłowego, ale wymaga w pierwszym etapie syntezy fosfinowego analogu kwasu glutaminowego. Obie drogi mają pewne zalety. Droga pierwsza jest bardziej rozgałęziona, co powoduje, że jest mniej etapów syntezy. Natomiast w drugim przypadku z otrzymanego fosfinowego analogu kwasu glutaminowego można otrzymać szereg różnorodnych strukturalnie produktów. W obu przypadkach pierwszym krokiem jest otrzymanie odpowiedniej pochodnej kwasu α -amino- γ -jodomasłowego.



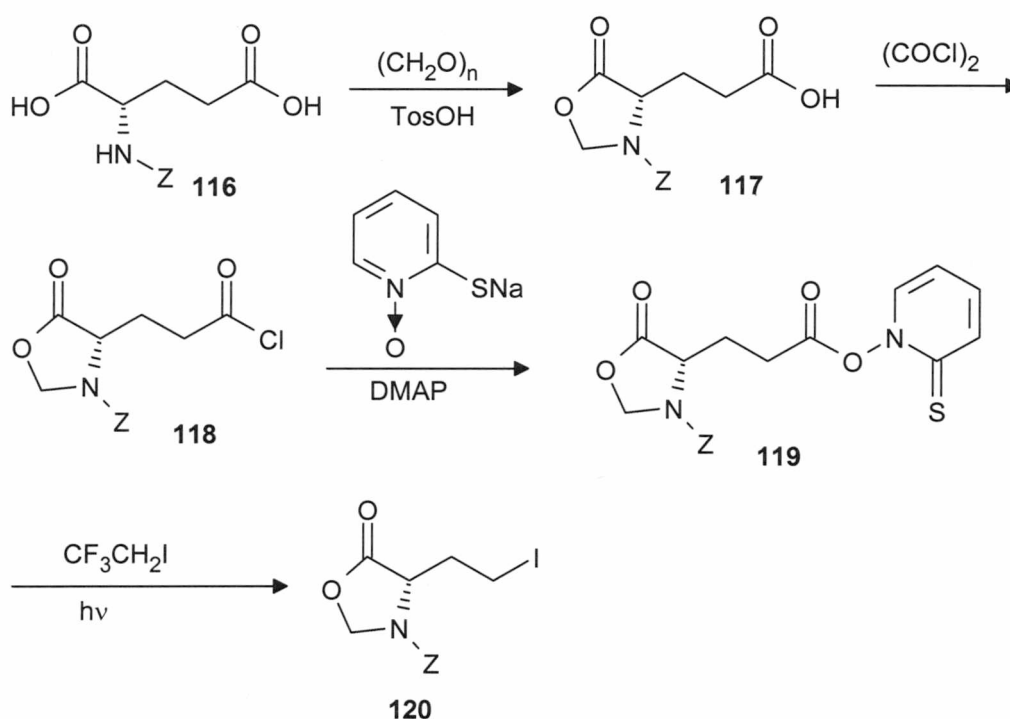
Schemat 3.4.

3.5.2. Synteza pochodnych kwasu α -amino- γ -jodomasłowego

Założono, że otrzymane produkty będą enancjomerycznie czyste, więc prekursorzy tych związków muszą także być indywidualnymi stereoizomerami. Odpowiednio zablokowany kwas α -amino- γ -jodomasłowy można najprościej otrzymać używając jako materiału wyjściowego jednego z naturalnych aminokwasów.

W pierwszym podejściu do syntezy pochodnych tego typu jako substratu użyto kwasu *N*-benzyloksykarbonylo-L-glutaminowego (**116**) (Schemat 3.5). W pierwszym

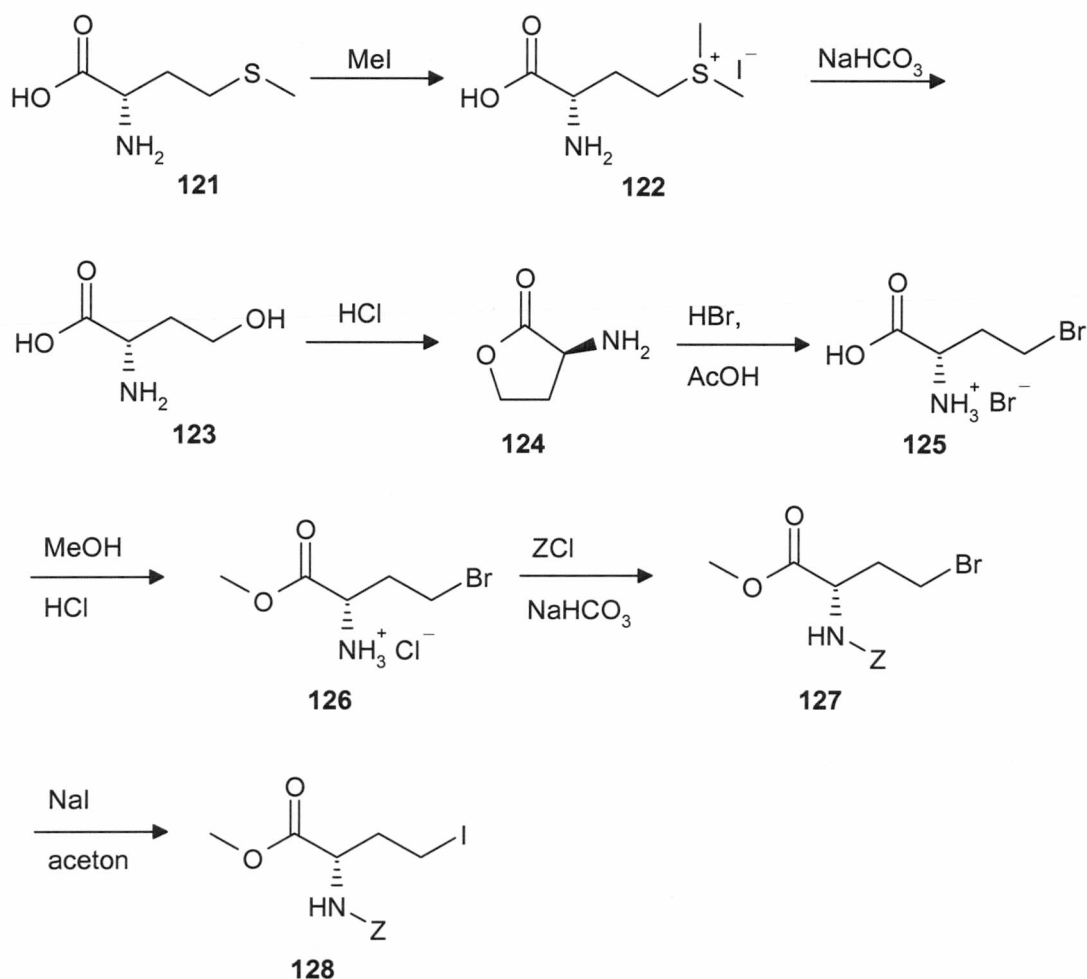
etapie syntezy zablokowano grupę α -karboksylową tego kwasu, tworząc pierścień izooksazolinowy w reakcji z paraformaldehdem (woda powstająca w reakcji była usuwana azeotropowo) [173]. Następnie w reakcji z chlorkiem oksalilu otrzymano odpowiedni chlorek kwasowy **118**. Do przekształcenia tak otrzymanego związku w jodopochodną **120** użyto reakcji degradacji Bartona [174, 175]. Reakcja chlorku kwasowego **118** z solą sodową *N*-tlenku 2-merkaptopirydyny dała tioester **119**. W reakcji rodnikowej (naświetlanie lampami wolframowymi) następowała degradacja reszty tioestrowej i powstawała żądana jodopochodna **120** [176]. Donorem jodu w tej reakcji był 2,2,2-trifluorjodoetan [177].



Schemat 3.5.

Niestety ta ścieżka syntezy ma kilka istotnych ograniczeń. Po pierwsze reakcja degradacji **119** zachodzi z niskimi wydajnościami (ok. 20%). Po drugie zwiększenie skali reakcji fotochemicznej jest bardzo trudne. Po trzecie, aby uzyskać 20% wydajność reakcji należy zastosować kilkukrotny (2.5-3.0) molowy nadmiar stosunkowo kosztownego 2,2,2-trifluorjodoetanu.

Wobec wad wyżej opisanej metodologii opracowano inną drogę syntezy pochodnej kwasu α -amino- γ -jodomasłowego (Schemat 3.6). W tym przypadku materiałem wyjściowym była L-metionina.



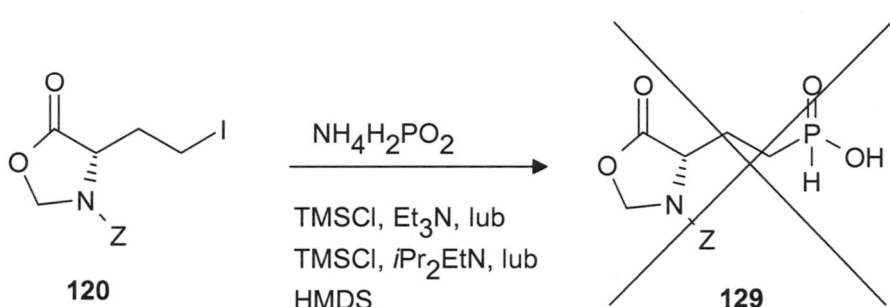
Schemat 3.6.

W pierwszym etapie atom siarki tego aminokwasu był alkilowany przy użyciu jodku metylu a następnie powstały związek **122** degradowano do L-homoseryny (**123**) w warunkach zasadowych [178-180]. W kolejnym etapie, podczas ogrzewania do wrzenia w kwasie solnym powstawał lakton L-homoseryny (**124**), który przekształcano w kwas L- α -amino- γ -bromomasłowy (**125**) w reakcji z bromowodorem w kwasie octowym. Następnie za pomocą standardowych metod zabezpieczono grupę karboksylową i aminową (zostały przekształcone odpowiednio w ester metylowy i *N*-benzyloksykarbonyłową pochodną) [181, 182] i w ostatnim etapie, w reakcji substytucji, wymieniono atom bromu na atom jodu używając jodku sodu w acetonie. Ta droga syntezy ma kilka zalet pomimo, że ilość etapów jest większa niż w poprzednim przypadku. Po pierwsze, wszystkie reakcje są proste i łatwe do przeprowadzenia na dużą skalę. Po drugie, stosowane substraty i reagenty są proste i stosunkowo mało

kosztowne. Dzięki temu można było otrzymać znaczną ilość związku **128**, który wykorzystano jako substrat w wielu kolejnych reakcjach.

3.5.3. Synteza kwasów H-fosfinowych*

W pierwszych próbach otrzymania wybranych związków zastosowano drugą drogę syntezy według Schematu 3.4. Kluczowym krokiem tej ścieżki jest synteza fosfinowego analogu kwasu glutaminowego **129** z jodopochodnej **120** jako substratu [183-187]. Nie okazała się ona skuteczna, gdyż pomimo znacznej ilości prób i zastosowania wielu różnych warunków reakcji, pożądany produkt powstawał tylko w ilościach śladowych (1-2%) (Schemat 3.7).



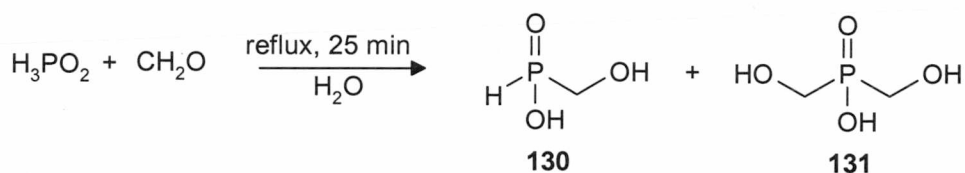
Schemat 3.7.

Niepowodzenie to zadecydowało, że syntezę pochodnych fosfinitricyny prowadzono pierwszą drogą zaprezentowaną na Schemacie 3.4, a mianowicie poprzez sprzęganie różnych kwasów fosfinowych z pochodną kwasu α -amino- γ -jodomasłowego. Kolejnym krokiem badań było więc przygotowanie serii odpowiednich kwasów H-fosfinowych.

Kwas hydroksymetylofosfinowy (**130**) otrzymano w reakcji formaldehydu i kwasu podfosforawego w roztworze wodnym (Schemat 3.8). W reakcji tego produktu z drugą cząsteczką formaldehydu powstaje także niepożądany kwas bis(hydroksymetylo)fosfinowy (**131**). Zminimalizowanie ilości tego produktu ubocznego w mieszaninie poreakcyjnej jest możliwe poprzez dobranie odpowiedniego czasu reakcji. Kontrolując reakcję za pomocą spektroskopii NMR wyznaczono taki czas reakcji, w którym przereagował już cały kwas podfosforawy, a kwas

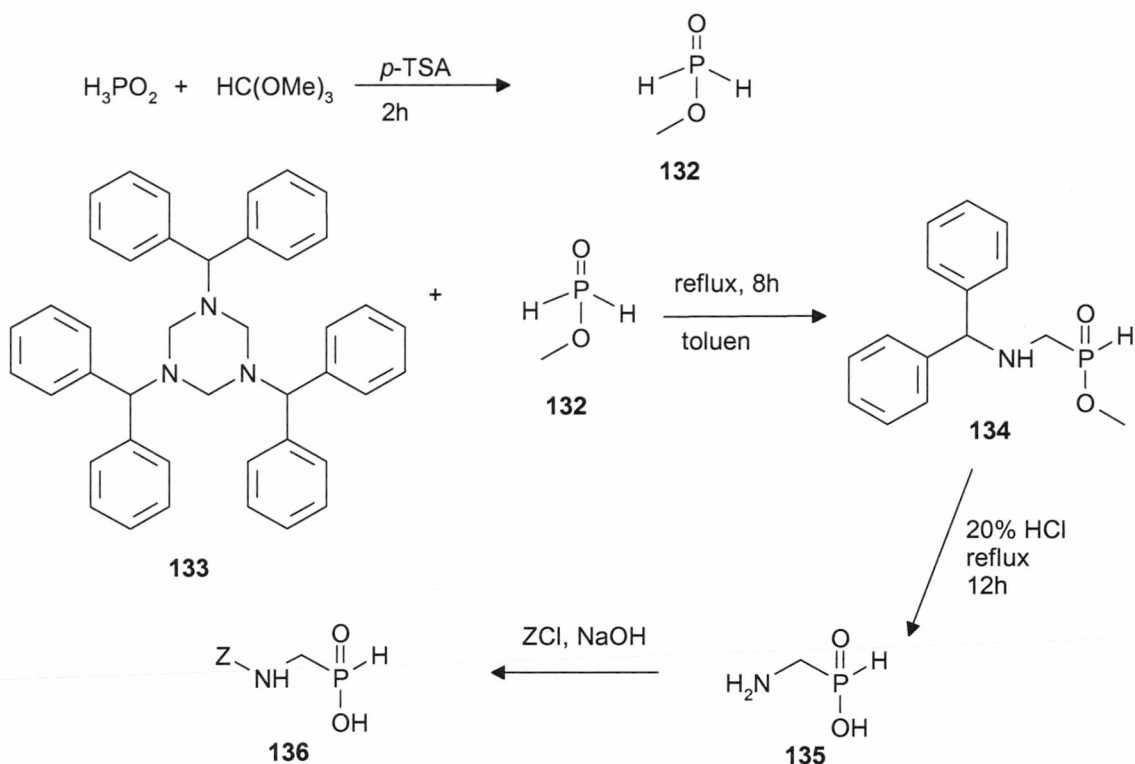
* W niniejszej pracy związki o wzorze ogólnym $R-PO_2H_2$ będą nazywane kwasami H-fosfinowymi w odróżnieniu od związków o wzorze ogólnym $R-P(O)(OH)-R'$, które będą nazywane kwasami C-fosfinowymi.

bis(hydroksymetylo)fosfinowy (**131**) powstawał w niewielkiej ilości. Tak otrzymany produkt użyto w dalszych reakcjach bez oczyszczania. W warunkach reakcji *P*-alkilowania kwasu hydroksymetylofosfinowego (**130**) pochodną **128**, kwas bis(hydroksymetylo)fosfinowy (**131**) nie może reagować, a po jej zakończeniu może być prosto oddzielony od produktu.



Schemat 3.8.

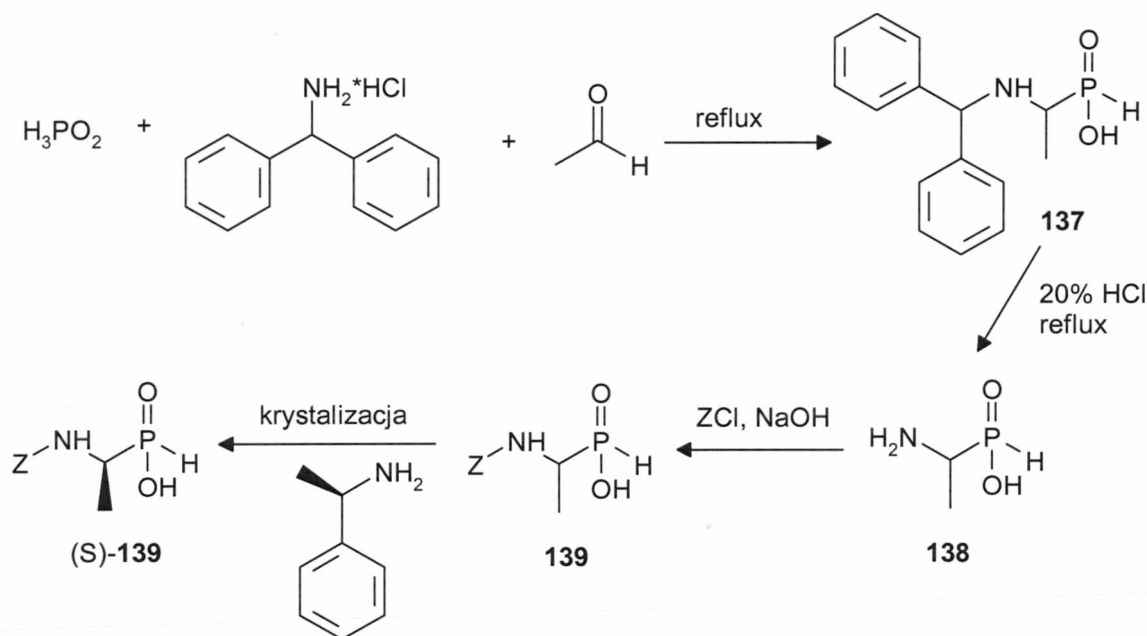
Fosfinowego analogu glicyny nie można otrzymać według standardowego protokołu otrzymywania kwasów α -aminoalkanofosfinowych opisanego przez Baylisa [188, 189]. Związek ten, zatem otrzymano używając estru metylowego kwasu podfosforawego (**132**) jako materiału wyjściowego (Schemat 3.9).



Schemat 3.9.

Ester ten powstaje z bezwodnego kwasu podfosforowego i ortomrówczanu metylowego w temperaturze pokojowej. Drugim substratem w tej reakcji była triazyna **133** zsyntezowana z formaldehydu i benzhydryloaminy. W wyniku reakcji tak przygotowanych substratów otrzymano ester metylowy kwasu *N*-difenylometylenoaminometanofosfinowego (**134**) [190, 191]. Hydroliza tego związku w warunkach kwaśnych pozwalała otrzymać fosfinowy analog glicyny (**135**), który przekształcano w *N*-benzyloksykarbonylową pochodną **136** potrzebną do dalszych reakcji.

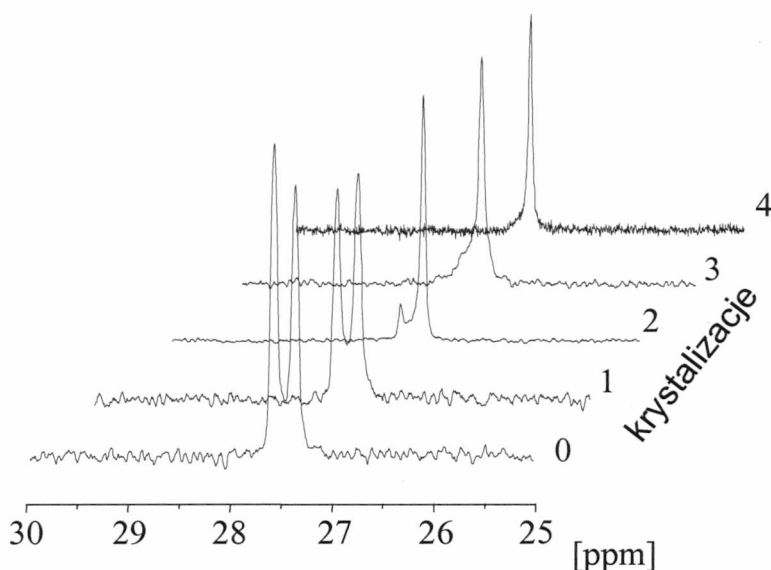
Kolejnym celem syntetycznym była *N*-blokowana pochodna fosfinowego analogu alaniny. W tym przypadku można zastosować metodę Baylisa syntezy kwasów α -aminoalkanofosfinowych [188]. W wyniku reakcji acetaldehydu, kwasu podfosforowego i chlorowodoru benzhydryloaminy otrzymano związek **137**, który przekształcono w fosfinowy analog alaniny **138** poprzez hydrolizę w warunkach kwaśnych (schemat 3.10). Następnie w reakcji z chloromrówczanem benzylu w warunkach zasadowych otrzymano pochodną *N*-benzyloksykarbonylową **139**. Ponieważ związek ten otrzymano w postaci mieszaniny racemicznej, a w niniejszej pracy założono otrzymanie związków enancjomerycznie czystych, kolejnym etapem tej syntezy było otrzymanieżądanego stereoizomeru.



Schemat 3.10.

Rozdziálu enancjomerów dokonano w wyniku kilkukrotnej krystalizacji soli kwasu **139** z (–)- α -metylobenzyloaminą. Standardowo przebieg tego typu krystalizacji jest obserwowany za pomocą polarymetrii oraz pomiaru temperatury topnienia. W tym

przypadku wykorzystano nową metodę, w której do analizy składu enancjomerycznego mieszaniny użyto techniki ^{31}P NMR i α -cyklodekstryny jako chiralnego dyskryminatora. Cyklodekstryna tworzy diastereomeryczne kompleksy inkluzyjne z badaną substancją, co jest widoczne w widmie ^{31}P NMR jako różnicowanie sygnałów pochodzących od poszczególnych enancjomerów. W przypadku mieszaniny racemicznej obserwowane były dwa sygnały o równych powierzchniach, natomiast po kolejnych etapach krystalizacji zwiększał się udział sygnału pochodzącego od jednego enancjomeru (Rysunek 3.16). Ostatecznie otrzymany enancjomerycznie czysty związek jest opisany przez widmo, na którym obserwowano tylko jeden sygnał. Metoda ta ma wiele zalet: jest szybka, prosta i wymaga bardzo niewielkiej ilości substancji. Dodatkową zaletą jest możliwość oznaczania składu enancjomerycznego zarówno czystego kwasu *N*-benzoksykarbonyloaminofosfininowego jak i jego soli z aminą użytą do krystalizacji.*



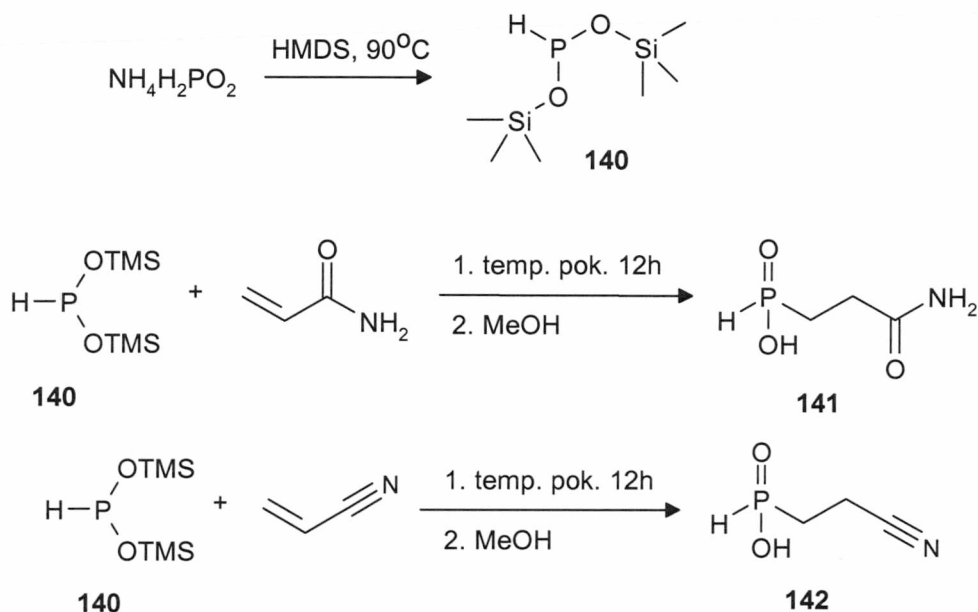
Rysunek 3.16.

Widma ^{31}P NMR mieszaniny soli (–)-metylobenzyloaminy i kwasu *N*-benzyloksykarbonylo-1-aminoetanofosfinowego (**139**) i α -cyklodekstryny (w stosunku 1:10) po kolejnych krystalizacjach z octanu etylu.

Kolejne dwa kwasy fosfinowe zostały otrzymane metodą addycji Michaela do diestru trimetylosililowego kwasu podfosforawego [183, 184]. Ester ten otrzymano przez reakcję heksametylodisilazanu (HMDS) z solą amonową kwasu podfosforawego (Schemat 3.11). W reakcji jego addycji do związku nienasyconego otrzymywany był początkowo ester trimetylosililowy kwasu H-fosfinowego, który rozkładano do kwasu

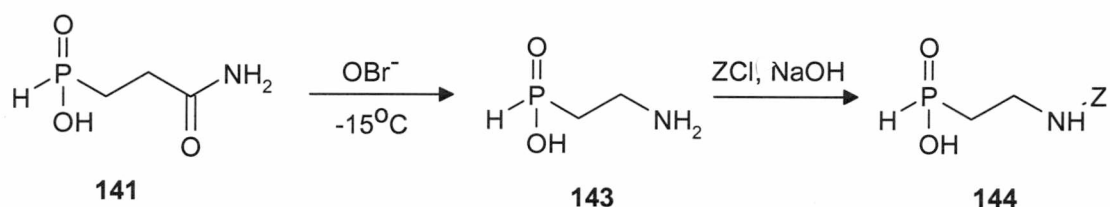
* Badania dotyczące tej metody przedstawiono w publikacjach (Lista publikacji pozycje 2 i 5). Nie są one opisane w niniejszej rozprawie ze względu na to, że wykraczają poza jej tematykę.

przez metanolizę. Reakcje addycji zachodziły z wysoką wydajnością już w temperaturze pokojowej zarówno w przypadku użycia jako substratu akrylamidu jak też i akrylonitrylu (Schemat 3.11). Jedynym problemem była możliwość powstawania symetrycznego bispodstawionego kwasu C-fosfinowego. Tę trudność można jednak pokonać przez odpowiednie dobranie stosunku molowego reagentów.



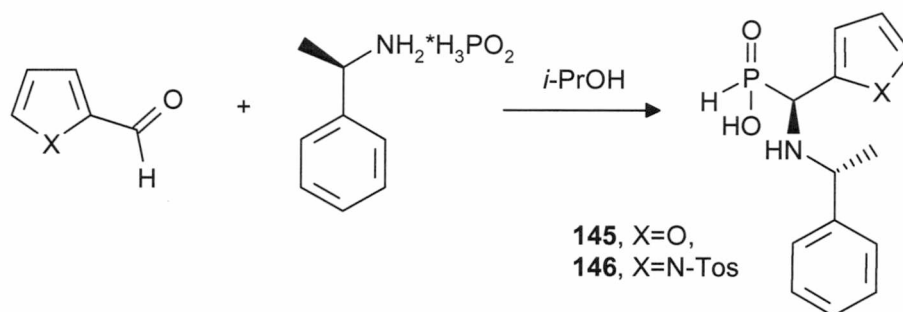
Schemat 3.11.

Następnym zadaniem była synteza kwasu *N*-benzyloksykarbonylo-2-aminoetanofosfinowego. W literaturze opisana jest synteza wolnego kwasu 2-aminoetanofosfinowego z użyciem nitroetyleny jako substratu [192]. Ze względu na niedostępność komercyjną tego substratu opracowana została znacznie korzystniejsza droga syntezy. Zastosowana została tu reakcja degradacji Hoffmana kwasu fosfinowego **141**, który otrzymano w jednej z wcześniejszych syntez (Schemat 3.12). Przeprowadzenie tej reakcji wymaga jednak dużej ostrożności — użyty podbromin bardzo łatwo utlenia kwas fosfinowy do fosfonowego. Dlatego też reakcja była wykonywana w przechłodzonym roztworze wodnym w temperaturze -15°C . Zastosowanie takich warunków umożliwia otrzymanie pożądanego kwasu z wysoką wydajnością i zahamowanie tworzenia się kwasu fosfonowego. *N*-Benzyloksykarbonylową pochodną kwasu 2-aminoetanofosfinowego **144** potrzebną do dalszych syntez otrzymano w standardowej reakcji z chloromrówczanem benzylu w warunkach zasadowych.



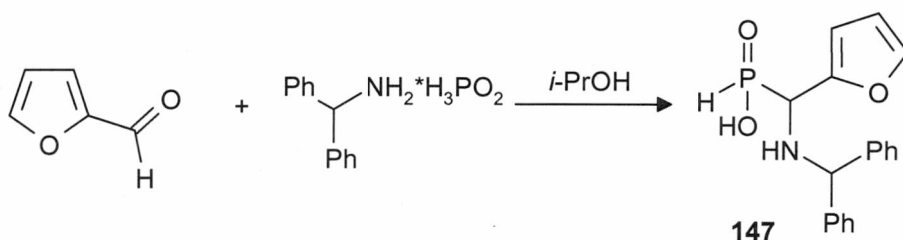
Schemat 3.12.

Przeprowadzono także próby otrzymania kwasów 1-amino-1-furylometanofosfinowego i 1-amino-1-pirolometanofosfinowego. W pierwszym podejściu do tego problemu zastosowano reakcję odpowiednich aldehydów z solą (R)-metylobenzyloaminy i kwasu podfosforowego w izopropanolu [193] (Schemat 3.13). Dzięki zastosowaniu enancjomerycznie czystej aminy otrzymano produkty (**145** i **146**), które także były indywidualnymi enancjomerami. Niestety usunięcie grupy metylobenzylowej okazało się niemożliwe. Próby redukcji wodorem przy użyciu katalizatora palladowego nie powiodły się ze względu na to, iż kwas fosfinowy zatrzymał katalizator.



Schemat 3.13.

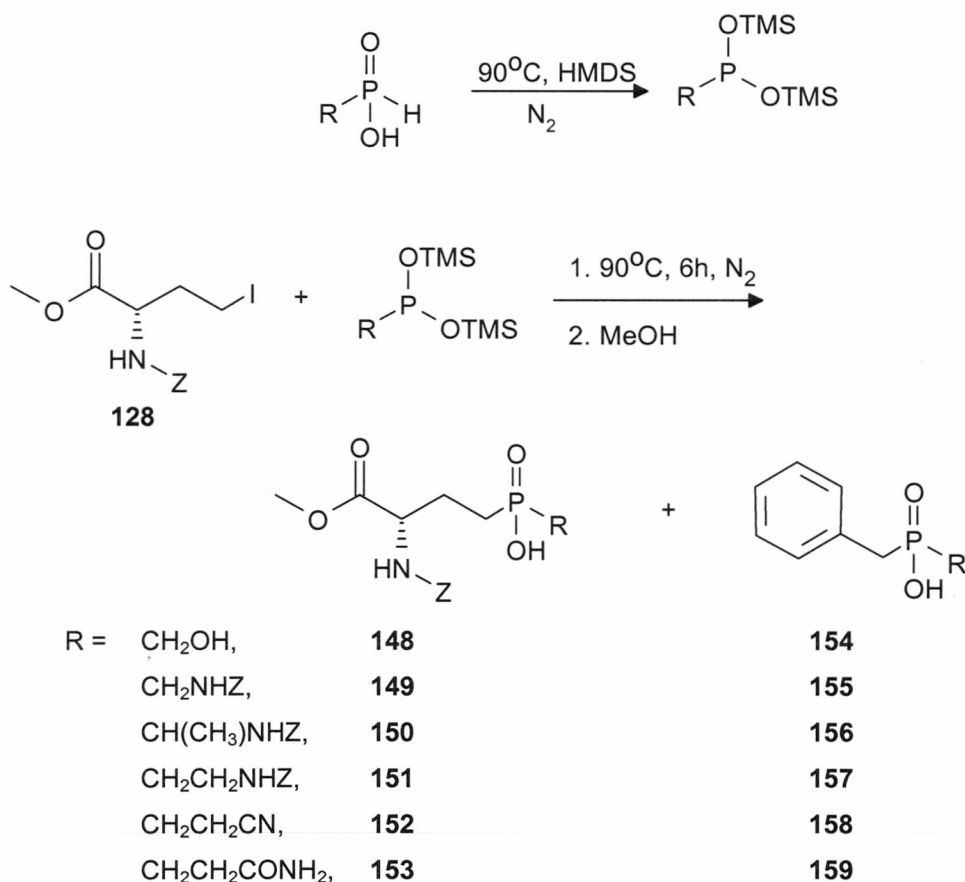
Drugą próbę otrzymania kwasu 1-amino-1-furylometanofosfinowego podjęto stosując metodę Baylisa (Schemat 3.14) [188]. Także w tym przypadku otrzymano *N*-podstawioną pochodną **147**, której przekształcenie w wolny aminokwas nie było możliwe. Po zastosowaniu standardowej metody odblokowania z użyciem stężonego kwasu solnego obserwowano całkowity rozpad związku.



Schemat 3.14.

3.5.4. Sprzęganie kwasów H-fosfinowych z pochodną kwasu α -amino- γ -jodomasłowego

W celu otrzymania zaprojektowanych związków, kwasy H-fosfinowe, których synteza została opisana w poprzednim rozdziale, użyto w reakcji sprzęgania z pochodną kwasu α -amino- γ -jodomasłowego. Reakcje przeprowadzano według protokołu syntezy bispodstawionych kwasów fosfinowych zaproponowanego przez Boyda [185, 194-199]. Reakcja składa się z dwóch etapów (Schemat 3.15). Na początku kwas fosfinowy jest ogrzewany do temperatury około 90°C w heksametylodysilazanie i w tej reakcji tworzy się diester trimetylosililowy tego kwasu. Następnie mieszaninę ochładza się i dodaje jodo-pochodną **128**, po czym ponownie ogrzewa do temperatury około 90°C. W wyniku tej reakcji tworzy się ester trimetylosililowyżądanego kwasu C-fosfinowego. Ester ten można rozłożyć do kwasu przy pomocy metanolu w temperaturze pokojowej.

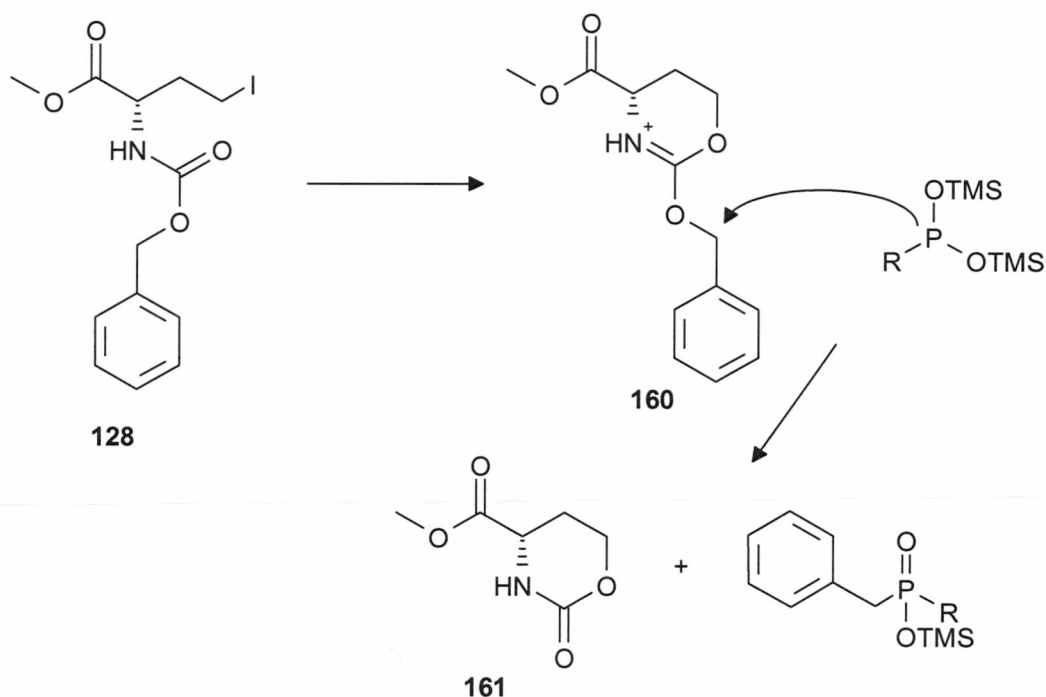


Schemat 3.15.

Pierwszym problemem napotkanym w tej serii syntez było nieoczekiwane powstawanie dużej ilości kwasu fosfonowego o strukturze analogicznej do użytego kwasu fosfinowego. Ponieważ początkowo reakcje prowadzono w atmosferze azotu o

czystości technicznej (95%), założono, że diester trimetylosililowy kwasu fosfinowego był utleniany bezpośrednio tlenem z powietrza. Zostało to potwierdzone przez wyniki reakcji prowadzonych w atmosferze azotu o wysokiej czystości (5.0), gdzie ilości produktów utleniania były znacznie mniejsze.

Reakcje tego typu dobrze przebiegają dla wielu prostych halogenopochodnych, jednakże w przypadku zastosowanej w tej pracy pochodnej kwasu α -amino- γ -jodomasłowego powstają także dosyć nieoczekiwane produkty — kwasy *P*-benzyloalkanofosfinowe (związki **154-159**). Dane literaturowe mówią, że w przypadku reakcji podobnej pochodnej kwasu α -amino- γ -jodomasłowego z fosforem trietylowym oprócz oczekiwanego estru kwasu fosfonowego powstaje także ester dietylowy kwasu benzylofosfonowego [195]. Ponieważ diester trimetylosililowy kwasu alkilofosfinowego jest reagentem podobnym do fosforynu trietylowego to i mechanizm tej reakcji wydaje się być analogiczny do opisanej w literaturze (Schemat 3.16). W pierwszym etapie w wyniku wewnątrzcząsteczkowej reakcji pochodna **128** cyklizuje. Następnie diester trimetylosililowy kwasu alkilofosfinowego atakuje benzylovą atom węgla związku **160** i powstaje kwas benzyloalkilofosfinowy i związek **161**. Dodatkowym potwierdzeniem proponowanego mechanizmu jest wydzielenie produktu ubocznego tej reakcji — związku **161**.



Schemat 3.16.

Zestawienie stosunku ilości oczekiwanego produktu do ilości produktu benzylowania przedstawia Tabela 3.9. W czterech przypadkach (wiersze 2-5) otrzymano podobne ilości związku oczekiwanego i benzylofosfinianu. W przypadku pochodnych hydroksymetylofosfinowych ilości produktu benzylowego były niewielkie. Natomiast dla analogów z podstawnikiem 2-cyjanoetylowym nie udało się otrzymać oczekiwanego związku. Niestety na podstawie posiadanych danych trudno jest wnioskować, w jaki sposób struktura podstawnika wpływa na przebieg reakcji, a tym samym na wzajemne ilości poszczególnych produktów.

Tabela 3.9.

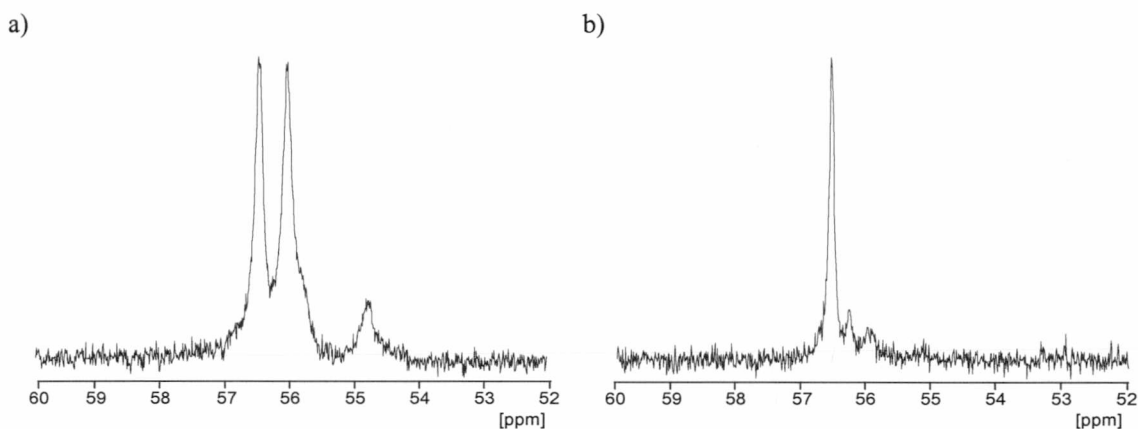
Podsumowanie wyników reakcji sprzęgania kwasów H-fosfinowych ze związkiem (..).

nr	R	Stosunek ilości produktu oczekiwanego do produktu benzylowania*	Wydajność po oczyszczeniu i odblokowaniu
1	-CH ₂ OH	2.0 – 10.0	16.9
2	-CH ₂ NHZ	0.9 – 1.0	1.1
3	-CH(CH ₃)NHZ	0.6 – 0.7	7.4
4	-CH ₂ CH ₂ NHZ	1.0 – 1.1	5.2
5	-CH ₂ CH ₂ CONH ₂	1.2 – 1.7	17.0**
6	-CH ₂ CH ₂ CN	<0.01	0

* Iloraz ten określono na podstawie widm ³¹P NMR. Podano zakres wartości otrzymanych w różnych powtórzeniach reakcji.

** Po odblokowaniu otrzymano związek z grupa karboksylową zamiast amidowej.

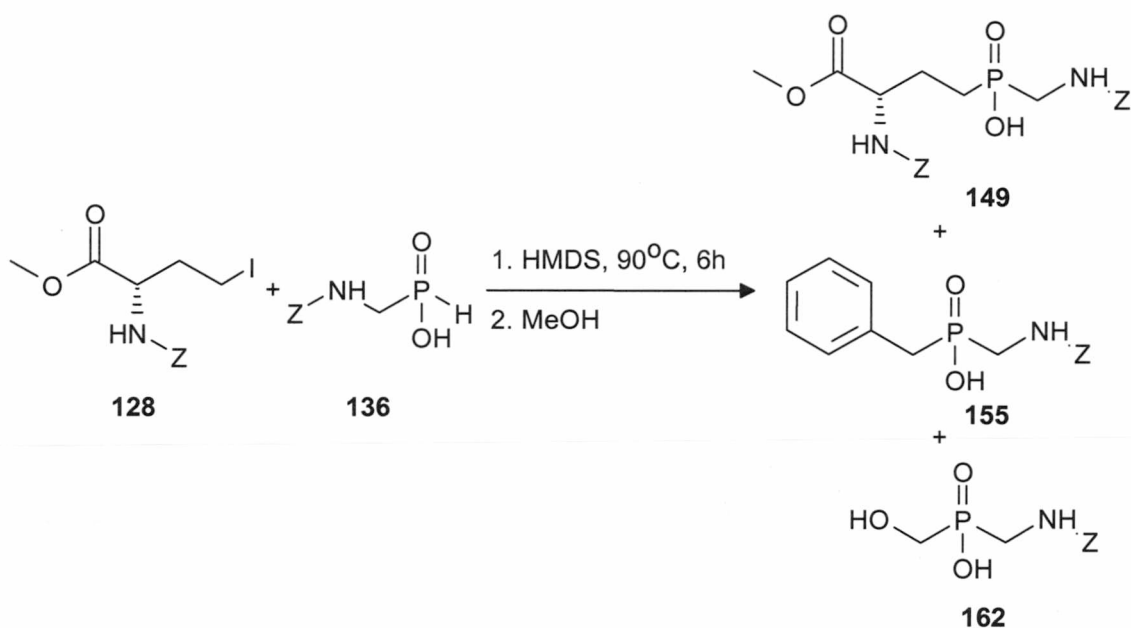
Synteza związku **150** została przeprowadzona w dwóch wariantach — z użyciem racemicznego kwasu *N*-benzyloksykarbonylo-1-aminoetanofosfinowego (**139**) i kwasu enancjomerycznie czystego (o konfiguracji absolutnej *S*). W przypadku produktu reakcji z racemicznym kwasem fosfinowym na widmie ¹³P NMR (Rysunek 3.17.a) zaobserwowano dwa sygnały pochodzące od dwóch diastereoizomerów. Natomiast w wyniku reakcji ze związkiem (*S*)-**139** na widmie ³¹P NMR (Rysunek 3.17.b) otrzymano tylko jeden rezonans. Ten wynik bardzo prosto udowadnia, że oba substraty (związki **128** i **139**) użyte w tej reakcji były enancjomerycznie czyste.



Rysunek 3.17.

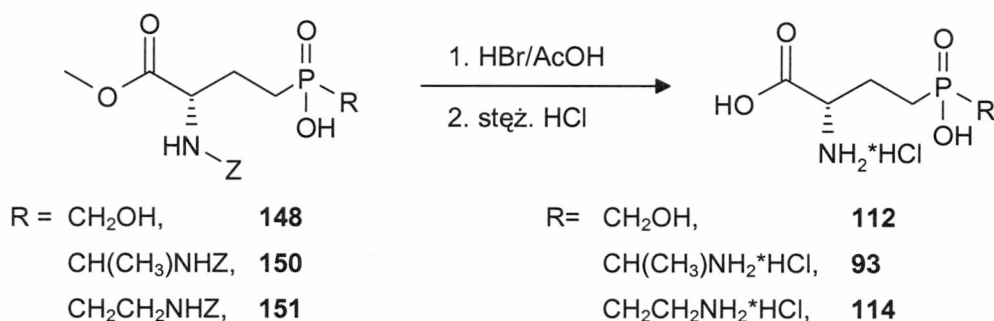
Widma ^{31}P NMR oczyszczonych produktów reakcji sprzęgania związku **128** z: a) racemicznym kwasem fosfinowym **139**; b) enancjomerycznie czystym (S)-**139**.

W przypadku związku **149** sytuacja była jeszcze bardziej skomplikowana. Poza ubocznym produktem benzylowania **155**, powstawał kolejny nieoczekiwany związek — kwas *P*-hydroksymetylo-*N*-benzyloksykarbonyloaminometanofosfinowy (**162**) (Schemat 3.17). Związek ten najprawdopodobniej powstaje w reakcji formaldehydu z diestrem trimetylosililowym kwasu fosfinowego (**136**). Natomiast formaldehyd może być produktem rozpadu tego diestru.



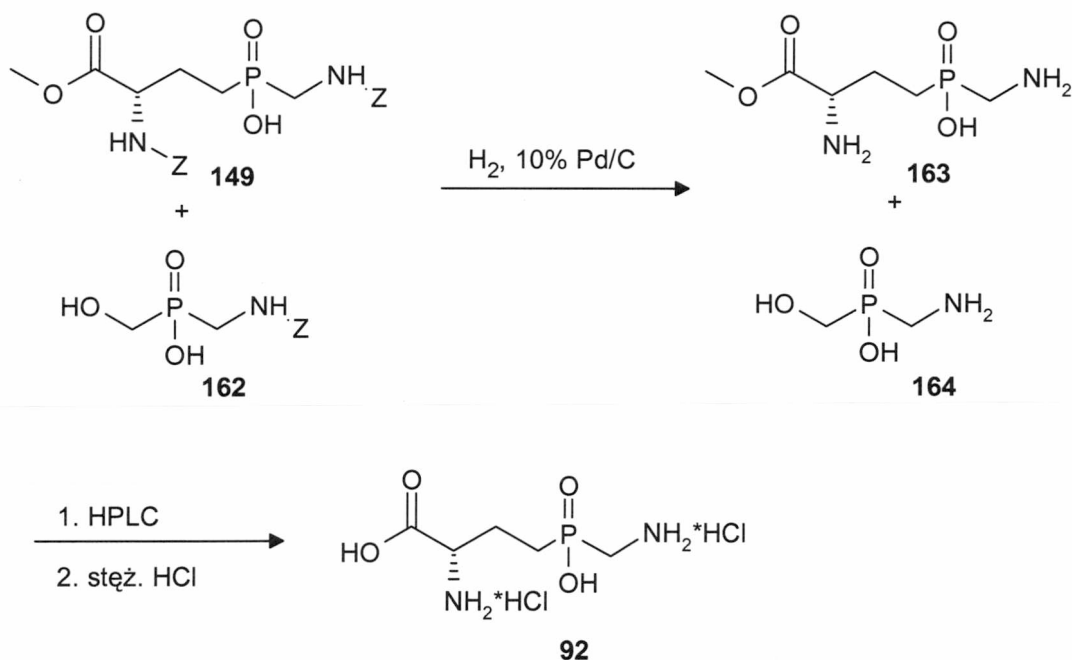
Schemat 3.17.

Kolejnym krokiem przedstawianych syntez było usunięcie zabezpieczeń grup aminowych i karboksylowych. W przypadku związków **148**, **150**, **151** procedura była bardzo prosta. W pierwszym etapie usuwano grupę *N*-benzyloksykarbonylową za pomocą 30% roztworu bromowodoru w kwasie octowym w temperaturze pokojowej (schemat 3.18). Następnie produkt tej reakcji ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną w stężonym kwasie solnym hydrolizując w ten sposób ester metylowy.



Schemat 3.18.

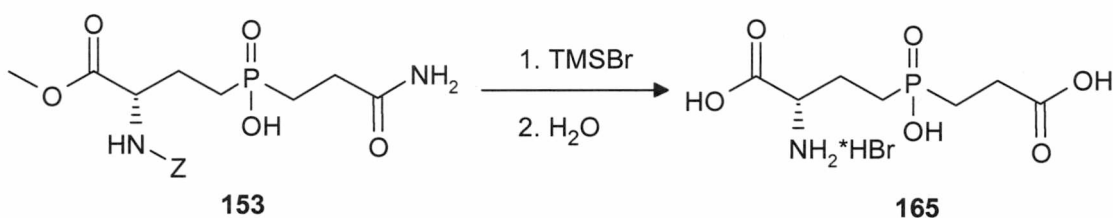
Dla związku **149** konieczne było opracowanie innej metody, ze względu na to, że nie udało się oddzielić związku **162** od właściwego produktu reakcji zarówno w formie zablokowanej, jak po całkowitym usunięciu reszt ochronnych (po zastosowaniu procedury odblokowania opisanej powyżej). W pierwszym kroku usunięto grupy *N*-benzyloksykarbonylowe z obu związków za pomocą wodoru z użyciem katalizatora palladowego (10% Pd / C) (Schemat 3.19).



Schemat 3.19.

Następnie związki te rozdzielono za pomocą preparatywnego HPLC, a otrzymany czysty ester **163** poddano hydrolizie stężonym kwasem solnym.

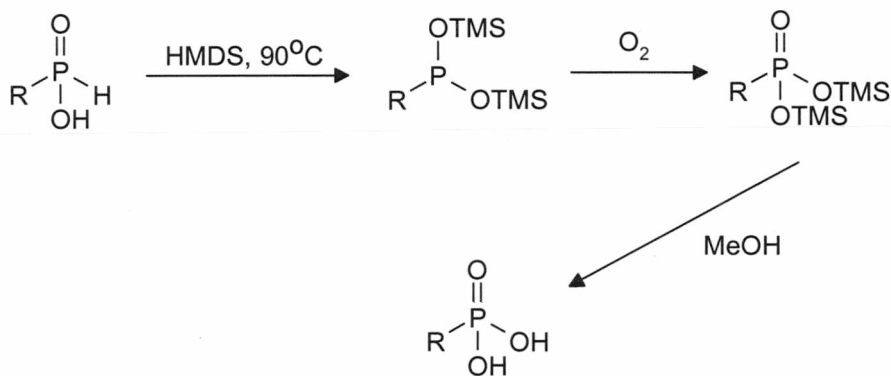
Ze względu na obecność grupy amidowej w związku **153** do odblokowania zastosowano łagodniejszą metodę z użyciem trimetylobromosilanu i hydrolizą powstałej pochodnej trimetylosililowej wodą. Niestety w tym przypadku nie otrzymano oczekiwanego produktu, ale produkt hydrolizy amidu do kwasu (**165**) (Schemat 3.20).



Schemat 3.20.

3.5.5. Utlenianie kwasów H-fosfinowych

Zaobserwowane utlenianie diestrów trimetylosililowych kwasów fosfinowych za pomocą atmosferycznego tlenu wydawało się być warte bardziej szczegółowej analizy. Pomimo wielu prac, w których kwasy fosfinowe są używane jako prekursory kwasów fosfonowych nie znaleziono doniesień na temat możliwości ich bezpośredniego utleniania tlenem. Doświadczenia, w których kwasy fosfinowe były ogrzewane w heksametylodysilazanie do temperatury około 90°C z dostępem powietrza wykazały, że w przypadku wielu związków reakcja ta zachodzi bardzo wydajnie dając odpowiednie estry kwasów fosfonowych (Schemat 3.21).



Schemat 3.21.

Kwasy fosfonowe można łatwo wydzielić po metanolizie otrzymanego estru. Zestawienie czasów reakcji (monitorowanej za pomocą ^{31}P NMR) dla jedenastu kwasów fosfinowych przedstawia Tabela 3.10. Duża część badanych związków utleniała się ilościowo już po około 1h. Te badania wyjaśniają zaobserwowane trudności podczas reakcji *P*-alkilowania tych kwasów w podobnych warunkach w atmosferze azotu o czystości technicznej — nawet niewielka ilość tlenu prowadziła do ubocznych produktów utleniania.

Tabela 3.10.

Zestawienie czasów reakcji utleniania za pomocą tlenu atmosferycznego.

L.p	R	RPO ₂ H ₂	RPO ₃ H ₂	Czas reakcji [h]*	Wydajność [%]**
1	-CH ₂ OH	130	171	12	80
2	-CH ₂ NH ₂	135	172	6.0	65
3	-CH ₂ NHZ	136	173	0.5	>95
4	-CH(CH ₃)NHZ	139	174	1.0	>95
5	-CH ₂ CH ₂ NHZ	144	175	2.0	>95
6	-CH ₂ CH ₂ CONH ₂	141	176	6.0	70
7	-CH(CH ₂ Ph)NHZ	166	177	1.0	>95
8	-CH(CH ₂ CH ₂ Ph)NHZ	167	178	3.0	>95
9	-CH(Ph)NHZ	168	179	3.0	80
10	-CH(CH ₂ CH(CH ₃) ₂)NHZ	169	180	1.0	>95
11	-CH(CH ₂ CH(CH ₃) ₂)NHFmoc	170	181	6.0	90

* Reakcję prowadzono do zaniku kwasu fosfinowego, co było monitorowane za pomocą ^{31}P NMR.

** Wydajność reakcji określono na podstawie widm ^{31}P NMR.

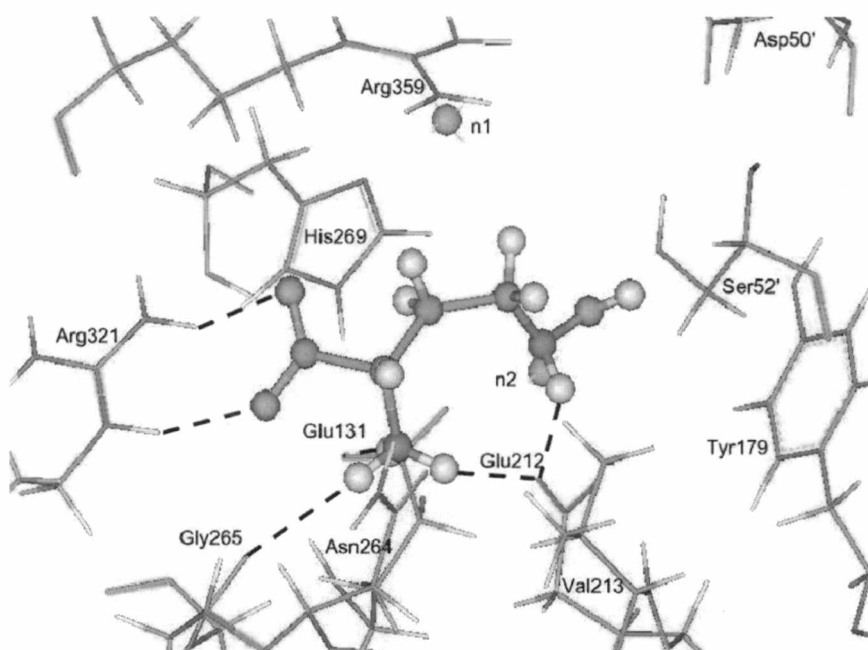
Z drugiej strony można potraktować tę reakcję jako bardzo dobry, stosunkowo uniwersalny sposób utleniania kwasów fosfinowych, gdyż samo utlenianie zachodzi w łagodnych warunkach i przy użyciu bardzo słabego utleniacza, jakim jest atmosferyczny tlen. W wielu przypadkach sposób ten jest szczególnie korzystny w porównaniu ze

standardowo stosowaną metodą utleniania kwasów fosfinowych za pomocą wody bromowej, która może reagować z wieloma grupami funkcyjnymi [193]. Co więcej, przeprowadzenie reakcji i wydzielanie czystego produktu także jest bardzo łatwe (ogrzewanie z dostępem powietrza i metanoliza). Jednakże reakcja ta nie daje bardzo dobrych wyników dla wszystkich związków. W przypadku reakcji wymagających dłuższego czasu obserwowano rozpad wiązania C-P (związki **130**, **135**, **141**, **168**). Natomiast dla pochodnej z funkcją Fmoc (**170**) następowało częściowe odblokowanie grupy aminowej (powstawało 10% wolnego aminofosfonianu).

3.6. Projektowanie analogów kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego

W drugiej części projektu otrzymywania nowych potencjalnych inhibitorów syntetazy glutaminy — analogów kwasu glutaminowego postanowiono zbadać pochodne kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego (**65**). Związek ten wydaje się być atrakcyjną substancją wiodącą. Opublikowane dane wskazują, że jest to silny inhibitor syntetazy glutaminy, który można stosunkowo prosto zsyntezować [108]. Analogia strukturalna do innych silnych inhibitorów syntetazy glutaminy (fosfinotricyny i sulfoksyiminy metioniny) wskazuje, że po przyłączeniu się do enzymu grupa *N*-hydroksylowa tego związku jest fosforylowana przy udziale ATP.

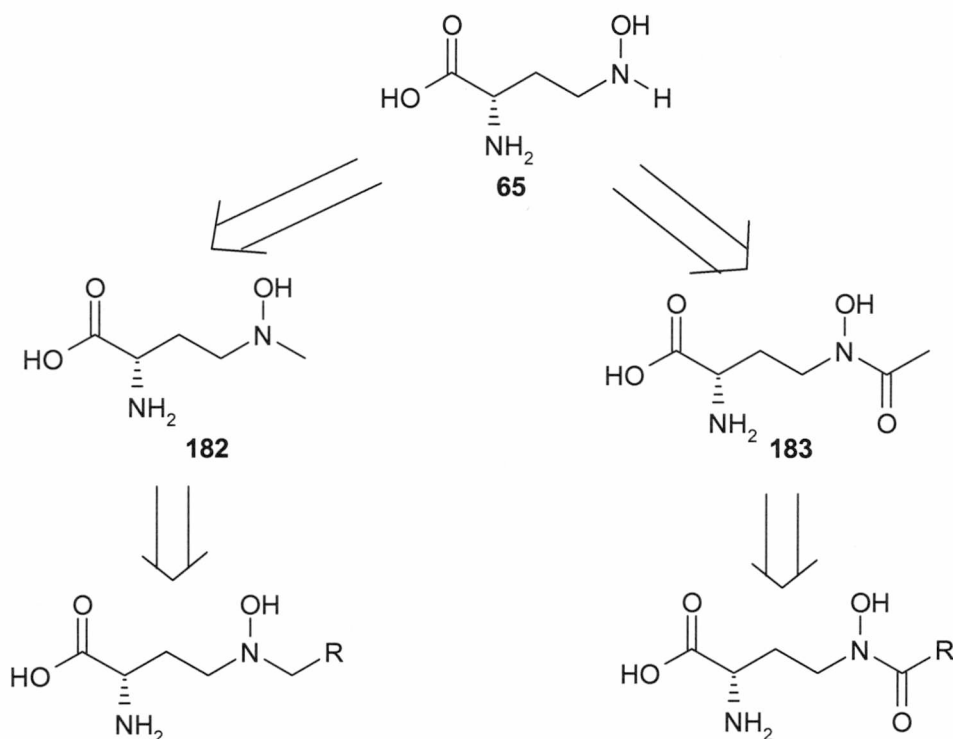
To założenie prowadzi do wniosku, że aktywne pochodne powinny mieć wolną grupę *N*-hydroksylową, a mogą być dodatkowo podstawione przy atomie azotu hydroksyloaminowego. Ze względu na dostępność syntetyczną najatrakcyjniejsze wydają się być pochodne 4-*N*-alkilowe i 4-*N*-acylowe. Jednakże w przypadku kompleksu związku **65** z syntetazą glutaminy hydroksyloaminowy fragment NH jest silnie zaangażowany w oddziaływanie z enzymem (Rysunek 3.18).



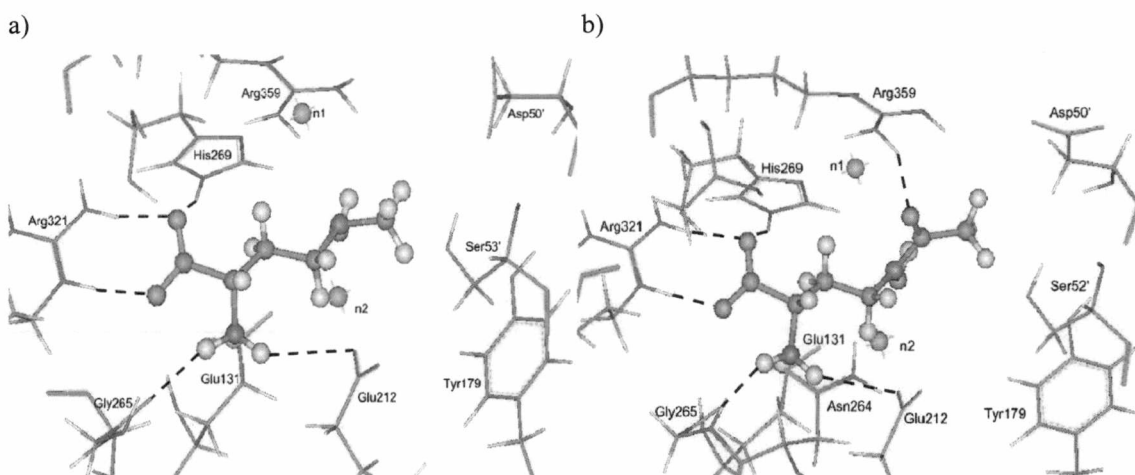
Rysunek 3.18.

Zoptymalizowana struktura kompleksów syntetazy glutaminy ze związkiem **65**.

Dla 4-*N*-podstawionych pochodnych to wiązanie nie będzie możliwe, co znacząco wpłynie na strukturę kompleksu. Aby na etapie projektowania nie popełniać takiego błędu, w pierwszym kroku zoptymalizowano struktury 4-*N*-metylowej (**182**) i 4-*N*-acylowej (**183**) pochodnej z syntetazą glutaminy (Schemat 3.22, Rysunek 3.19). Następnie struktury te użyto do projektowania nowych pochodnych za pomocą programu LUDI. Otrzymano odpowiednio dwie serie związków: 4-*N*-alkilowe i 4-*N*-acylowe.



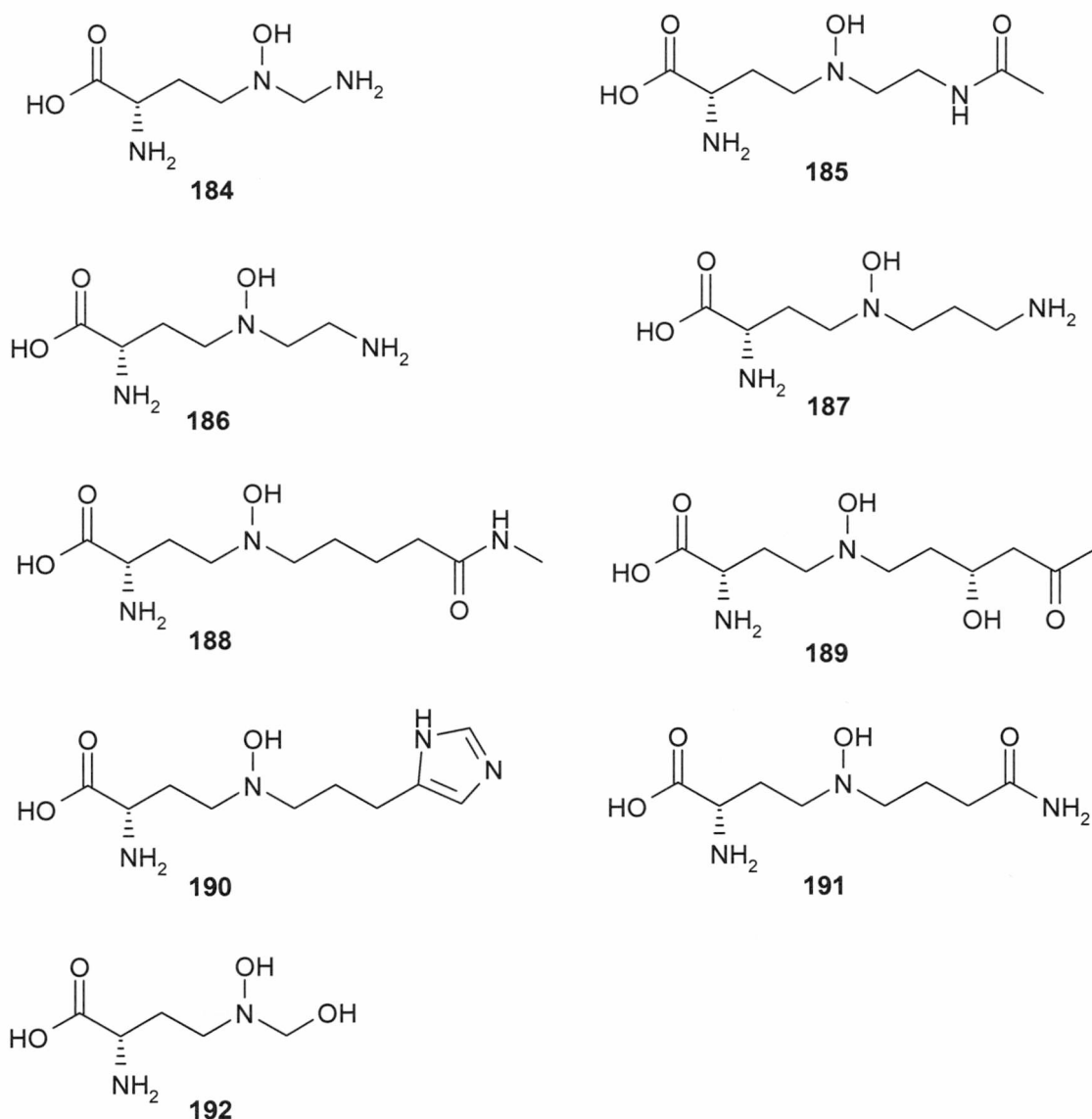
Schemat 3.22.



Rysunek 3.19.

Struktury kompleksów syntetazy glutaminy ze związkami: a) **182**, b) **183**.

Serię zaprojektowanych związków 4-*N*-alkilowych przedstawiono na Schemacie 3.23. Można zauważyć, że większość proponowanych podstawników zawiera atom azotu, najczęściej w postaci funkcji aminowej. Dodatnio naładowane grupy NH_3^+ są szczególnie korzystne ze względu na elektrostatyczne oddziaływania z ujemnie naładowaną powierzchnią wnęki katalitycznej. Możliwe jest także tworzenie wielu wiązań wodorowych. Co ważne, wiele z tych pochodnych ma stosunkowo prostą strukturę, co umożliwia nieskomplikowaną syntezę.



Schemat 3.23.

Zestawienie wartości funkcji oceniającej LUDI_1 dla zaprojektowanych związków i substancji wiodącej przedstawiono w Tabeli 3.11. Podobnie jak w przypadku pochodnych fosfinotricyny, oceniono struktury otrzymane za pomocą programu LUDI oraz te dodatkowo zoptymalizowane (pole siłowe cff97). Zablokowanie funkcji hydroksyloaminowej związku **65** przez grupę metylową (związek **182**) spowodowało znaczne pogorszenie wartości funkcji LUDI_1 (ponad 100 punktów). Ponieważ związek *N*-metylowany **182** był punktem startowym projektowania, otrzymane pochodne nie mają bardzo wysokiej oceny LUDI_1. Rozkład ocen poszczególnych typów oddziaływań (lipofilowe, jonowe i wiązanie wodorowe) jest zrównoważony. Jedynie w kilku przypadkach (**184**, **186**, **187**) obserwuje się wyższą wartość IONIC_SCORE.

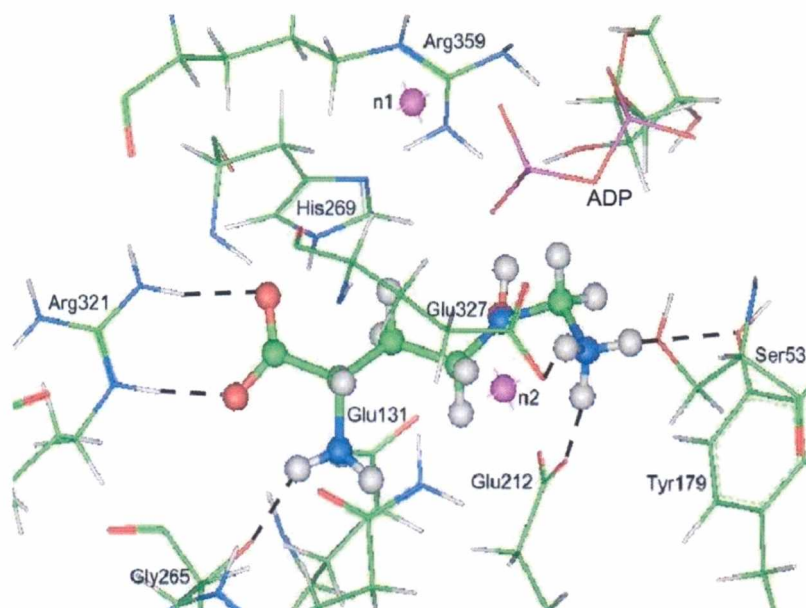
Tabela 3.11.

Zestawienie wartości funkcji oceniających dla struktur kompleksów syntetazy glutaminy z zaprojektowanymi analogami **182**.

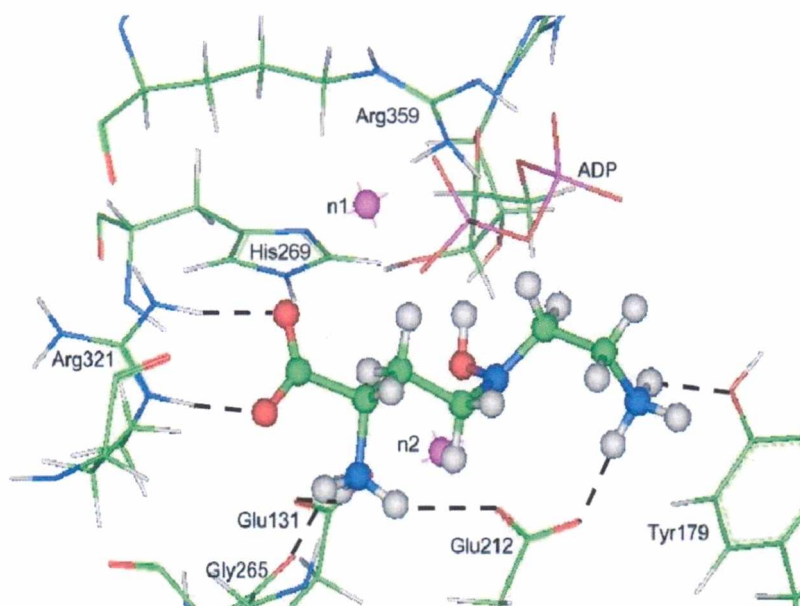
Ocena struktury otrzymanej przy pomocy programu LUDI					
Związek	Ocena struktury zoptymalizowanej				
	LUDI_1	HB_SCORE	LIPO_SCORE	IONIC_SCORE	
65	915	281	145	686	
182	800	268	287	442	
184	910	402	263	442	
	1067	359	242	688	
185	1046	396	405	442	
	1013	451	411	424	
186	900	268	304	576	
	984	386	290	556	
187	868	357	266	442	
	949	325	301	596	
188	891	353	420	442	
	937	396	449	416	
189	973	432	423	442	
	934	397	444	417	
190	1027	416	467	442	
	926	337	461	426	
191	805	303	358	442	
	923	459	346	416	
192	868	357	266	442	
	919	480	245	416	

Struktury kompleksów związków **184** i **186** z syntetazą glutaminy wyjaśniają dlaczego tak korzystne jest przyłączenie grupy aminowej do projektowanego inhibitora (Rysunek 3.20). Pomimo różnej długości łączników pomiędzy grupą aminową a hydroksyloaminową, sposób wiązania tych analogów do enzymu jest podobny. W obu przypadkach grupa aminowa oddziałuje z resztami aminokwasowymi tworzącymi wnękę wiążącą jon amonowy.

a)



b)

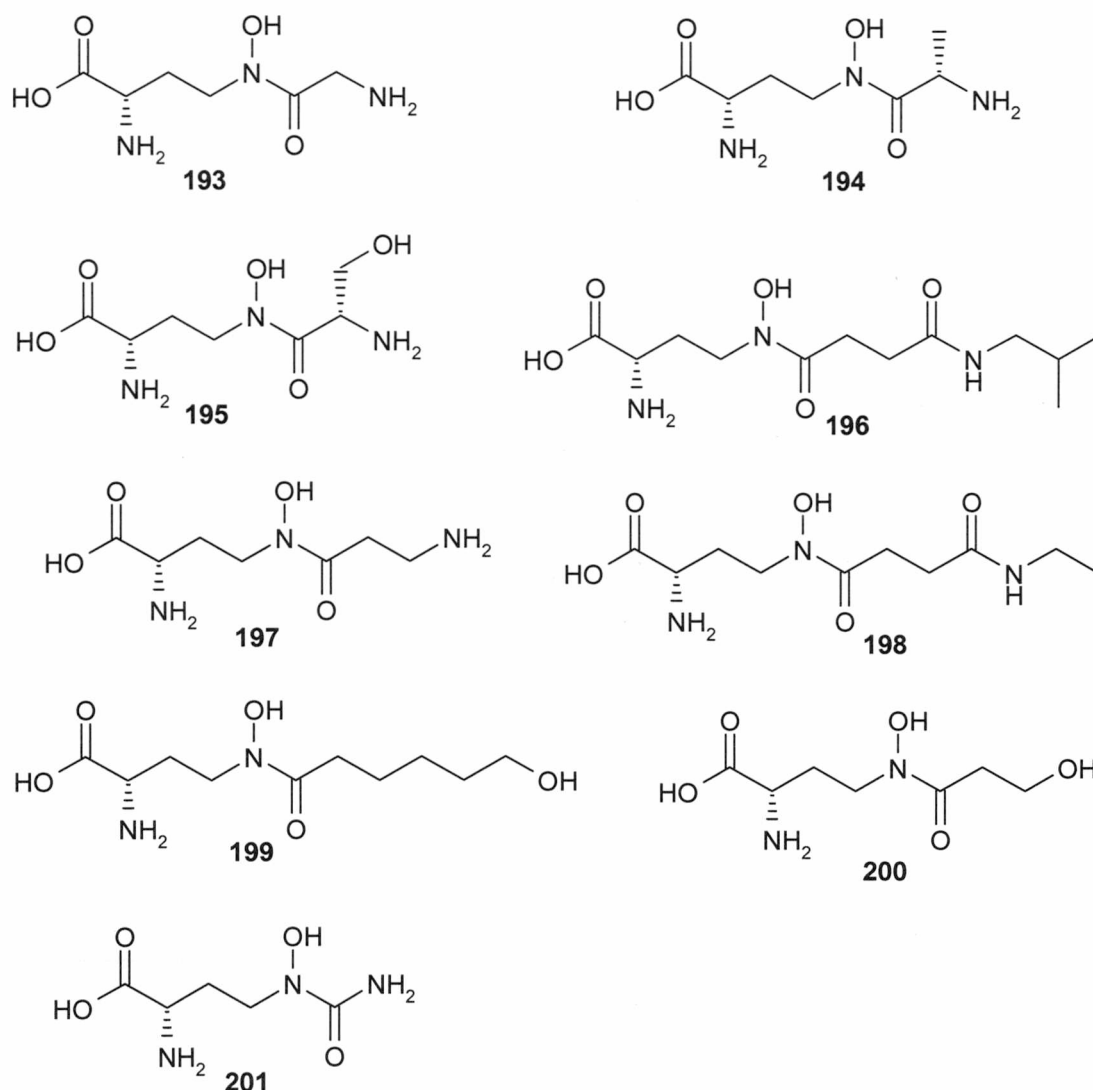


Rysunek 3.20.

Zoptymalizowane struktury kompleksów syntetazy glutaminy ze związkami: a) **184**, b) **186**.

Dla związku **184** interakcje z tą wnęką są korzystniejsze i możliwe jest utworzenie aż trzech wiązań wodorowych (do Glu327, Glu212 i Tyr179; Rysunek 3.20.a). Pochodna **186** jest związana mniej korzystnie przez dwa wiązania wodorowe (do Glu212 i Tyr179; Rysunek 3.20.b).

Drugą serię pochodnych zaprojektowano na podstawie struktury *N*-acylowej pochodnej związku **65** (Schemat 3.24). Podobnie jak w przypadku pierwszej serii związków przyłączane fragmenty zawierały najczęściej grupę aminową, która korzystnie oddziałuje z miejscem aktywnym enzymu. W kilku pochodnych dołączona została grupa –OH. Wiele z zaprojektowanych związków wydaje się być atrakcyjnych ze względu na to, że najprawdopodobniej są stosunkowo łatwo dostępne syntetycznie (jako pochodne związku **65** i naturalnych aminokwasów).



Schemat 3.24.

Związek **183** jest lepszym punktem startowym niż związek **182** w projektowaniu potencjalnie aktywnych analogów. Wartość funkcji oceniającej LUDI_1 dla **183** (893) jest zbliżona do oceny związku wiodącego **65** (913), pomimo zablokowania bardzo korzystnie oddziałującej z enzymem funkcji NH. Dobra wartość LUDI_1 dla związku **183** jest spowodowana tworzeniem dodatkowego wiązania wodorowego pomiędzy grupą C=O funkcji acylowej a resztą boczną Arg359 (Rysunek 3.19.b). Zestawienie wartości funkcji oceniających dla zaprojektowanych związków (Tabela 3.12) pokazuje, że wiele z nich powinno być znacząco bardziej aktywnych niż substancja wiodąca **65**. Dla wszystkich zaprojektowanych związków wartości funkcji oceniających poszczególne oddziaływania (HB_SCORE, LIPO_SCORE i IONIC_SCORE) są wysokie i zbliżone do siebie. Jednakże kluczowa dla wysokiej oceny ogólnej wydaje się być wartość funkcji IONIC_SCORE, której wartość rośnie wraz ze wzrostem wartości LUDI_1.

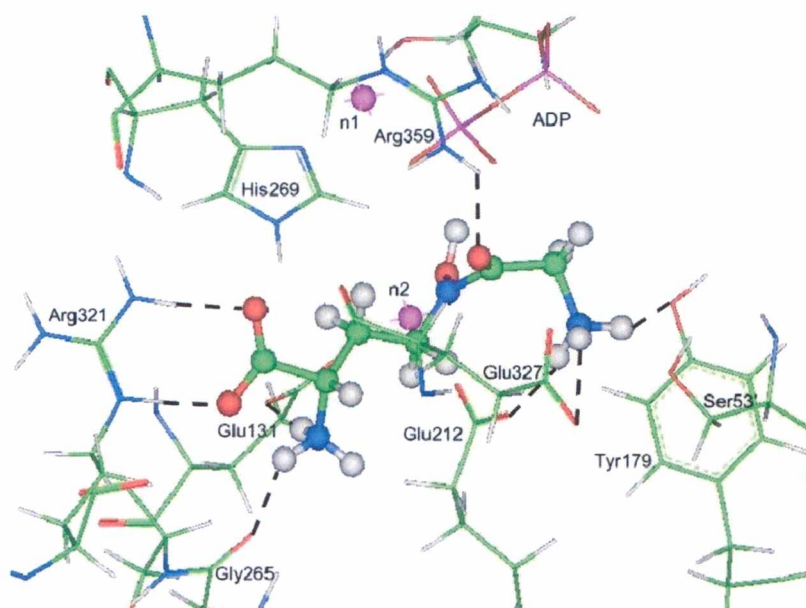
Tabela 3.12.

Zestawienie wartości funkcji oceniających dla struktur kompleksów syntetazy glutaminy z zaprojektowanymi analogami **183**.

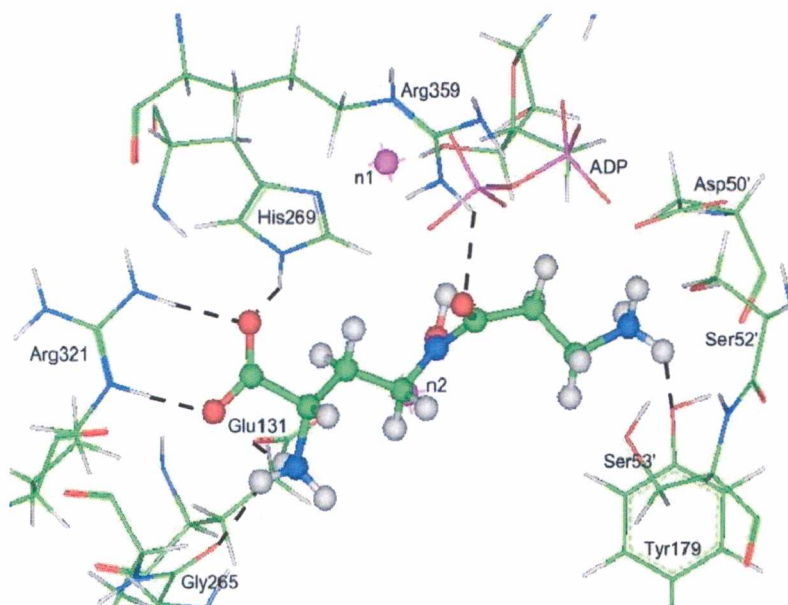
Ocena struktury otrzymanej przy pomocy programu LUDI					
Związek	Ocena struktury zoptymalizowanej				
	LUDI_1	HB_SCORE	LIPO_SCORE	IONIC_SCORE	
183	893	379	293	418	
193	875	419	272	406	
	1210	446	284	702	
194	901	419	298	406	
	1183	416	316	673	
195	914	458	298	406	
	1135	448	307	628	
196	973	406	473	418	
	1064	303	515	570	
197	876	399	307	418	
	1048	412	322	562	
198	1026	425	405	418	
	1016	303	441	570	
199	1040	451	393	418	
	1014	524	372	416	
200	923	428	325	418	
	923	444	310	417	
201	822	379	222	418	
	901	453	227	418	

Podobnie jak w pierwszej serii analogów **65** najlepsze wyniki daje przyłączenie do związku wiodącego fragmentu zawierającego funkcję aminową. Struktura kompleksu związku **193** z syntetazą glutaminy (Rysunek 3.21.a) pokazuje także podobny schemat oddziaływań — dodatkowa grupa aminowa jest wiązana w miejsce jonu amonowego w centrum aktywnym enzymu tworząc trzy wiązania wodorowe (z Glu212, Glu327 i Tyr179). Ten sposób wiązania jest także proponowany dla związków **194** i **195**.

a)



b)



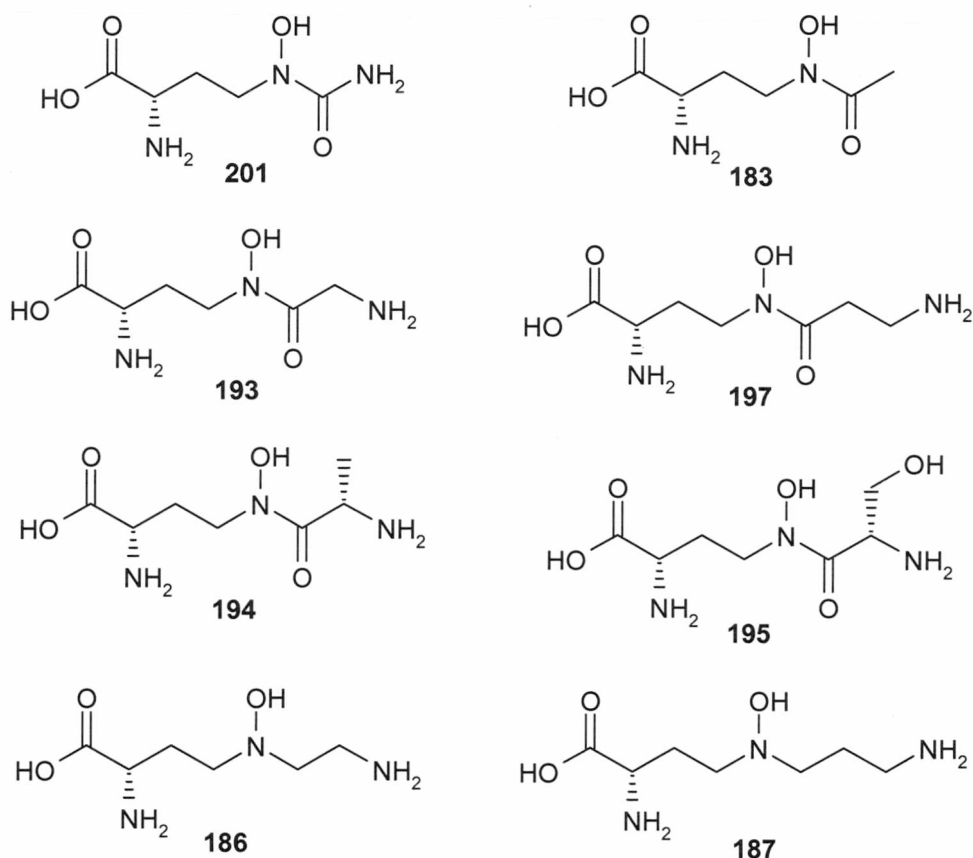
Rysunek 3.21.

Zoptymalizowane struktury kompleksów syntetazy glutaminy ze związkami: a) **193**, b) **197**.

W przypadku związku **197** oddziaływania z centrum aktywnym enzymu są podobne, choć nie tak korzystne (Rysunek 3.21.b), gdyż włączona w strukturę grupa aminowa może tworzyć tylko jedno wiązanie wodorowe z resztą aminokwasową Tyr179, co wiąże się ze znacznie niższą oceną ogólną.

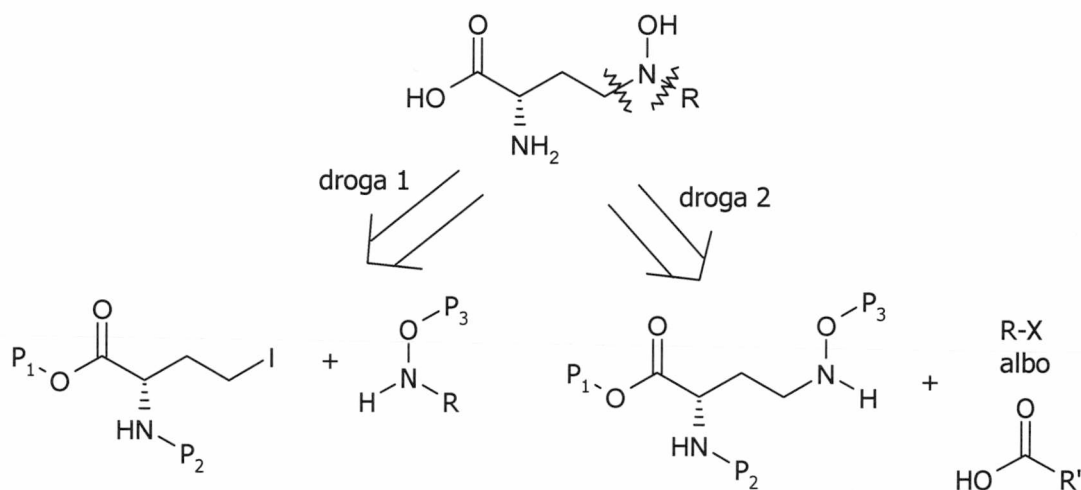
3.7. Synteza analogów kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego

Do syntezy wybrano grupę związków przedstawionych na Schemacie 3.25. Są to pochodne związku **65**, w których atom wodoru przy hydroksyloaminowym atomie azotu został zastąpiony podstawnikiem zawierającym dodatkową grupę aminową lub karboksylową.



Schemat 3.25.

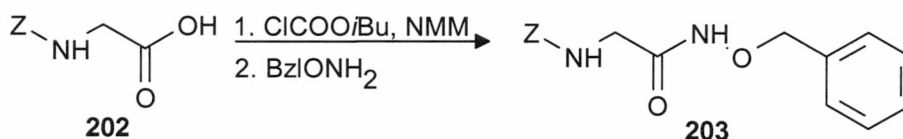
Analiza retrosyntetyczna tej grupy związków wskazuje dwie drogi ich syntezy (Schemat 3.26). Po pierwsze można dokonać rozłączenia po lewej stronie azotu hydroksyloaminowego, co prowadzi do zastosowania w syntezie pochodnych kwasu α -amino- γ -jodomasłowego i monopodstawionych pochodnych hydroksyloaminy bądź kwasów hydroksamowych (droga 1). Drugie podejście wskazuje na zastosowanie jako substratów pochodnej kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego i kwasów albo halogenopochodnych jako odpowiednich czynników acylujących lub alkilujących (droga 2).



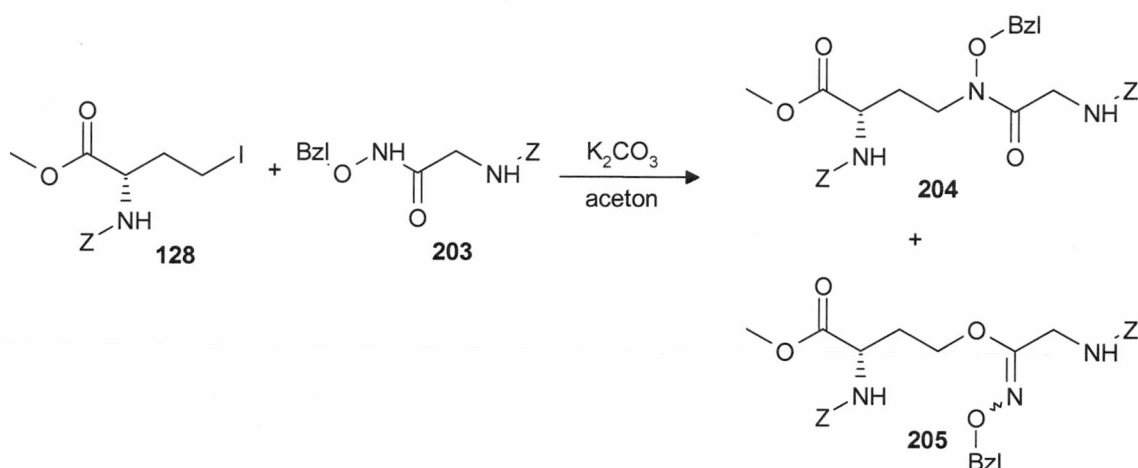
Schemat 3.26.

W początkowym etapie badań próbowano zastosować pierwszą drogę, głównie dlatego, że dysponowano efektywną metodą syntezy pochodnych kwasu α -amino- γ -jodomasłowego, a kwasy hydroksamowe są dosyć łatwo dostępne syntetycznie.

Kwas hydroksamowy **203** otrzymano z *N*-benzyloksykarbonyloglicyny i *O*-benzylohydroksyloaminy za pomocą metody mieszanych bezwodników (Schemat 3.27). Tak otrzymany związek (**203**) alkilowano jodopochodną **128** w roztworze acetonowym stosując bezwodny węgiel potasu jako zasadę. Taki schemat syntezy ma jednak pewne wady. Oprócz żądanego produktu **204** podstawienia atomu azotu w kwasie hydroksamowym powstaje drugi produkt **205**, gdzie podstawiony jest atom tlenu (Schemat 3.28). Oba związki otrzymywane są z podobną wydajnością, a bardzo zbliżona struktura chemiczna znacznie utrudnia rozdział. Niestety w literaturze nie znaleziono modyfikacji warunków reakcji, które pozwoliłyby otrzymywać jedynie zamierzony izomerów.

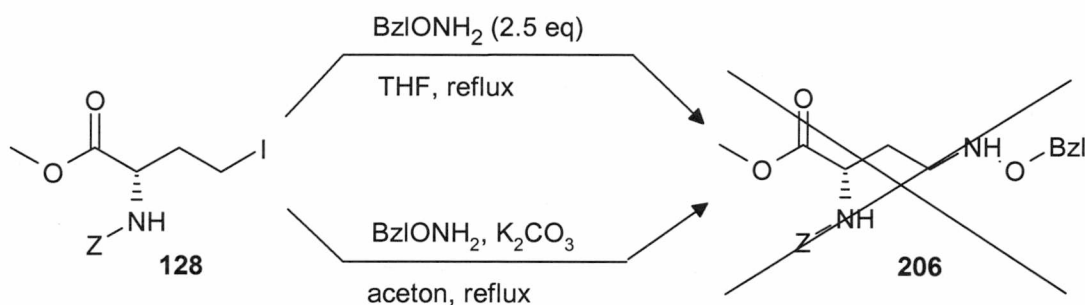


Schemat 3.27.



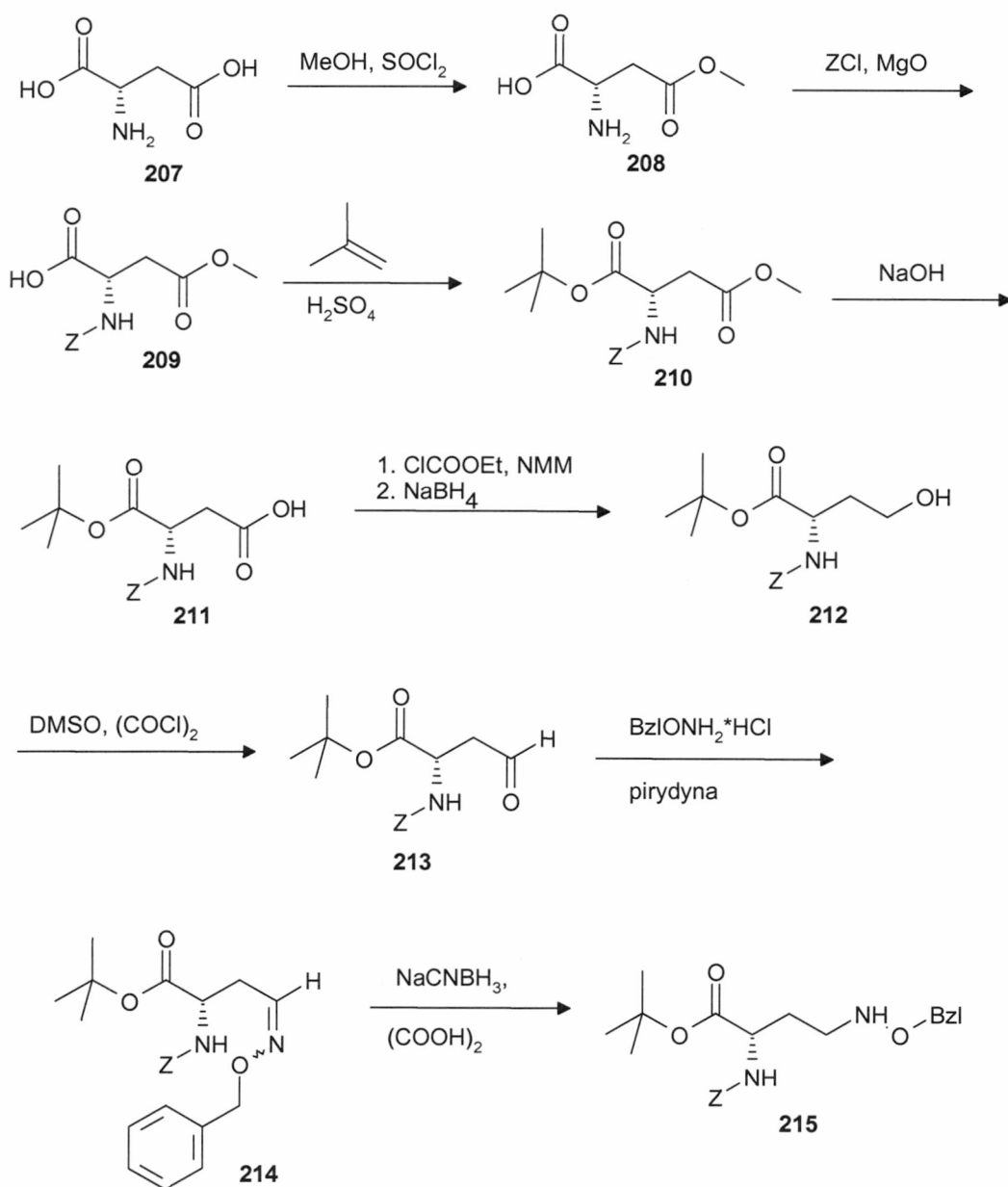
Schemat 3.28.

Te trudności spowodowały, że zastosowana została druga z możliwych dróg syntezy zaprojektowanych związków. Pierwszym krokiem tej ścieżki było otrzymanie pochodnej kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego. Pierwsze próby syntezy odpowiednio zablokowanej formy tego kwasu podjęto stosując jako substrat pochodną kwasu α -amino- γ -jodomasłowego (**128**). Najpierw próbowano zastosować, opisany w literaturze dla bardzo podobnych związków, schemat syntezy, gdzie halogenopochodna jest ogrzewana pod chłodnicą zwrotną z nadmiarem *O*-benzylhydroksyloaminy pełniącą w tej reakcji także funkcję zasady (Schemat 3.29) [200]. Niestety nie zaobserwowano powstawania oczekiwanego produktu **206**. Następnie zmodyfikowano warunki reakcji, prowadząc ją w acetonie z użyciem bezwodnego węglanu potasu jako zasady. Te próby alkilowania także nie przyniosły pozytywnego rezultatu.



Schemat 3.29.

Ze względu na negatywne wyniki reakcji z użyciem pochodnej kwasu α -amino- γ -jodomasłowego (**128**), wypróbowana została zupełnie inna ścieżka syntezy. Była to metoda analogiczna do opisanej przez grupę prof. Shigeo Nozoe [108]. W tym przypadku monopodstawioną pochodną hydroksyloaminy **215** otrzymano przez redukcję hydroksyimininy **214** za pomocą NaCNBH_3 w warunkach kwaśnych (Schemat 3.30). Natomiast hydroksyimina **214** została otrzymana w reakcji *O*-benzylohydroksyloaminy z pochodną aldehydu β -asparaginowego **213** prowadzonej w pirydynie jako rozpuszczalniku.

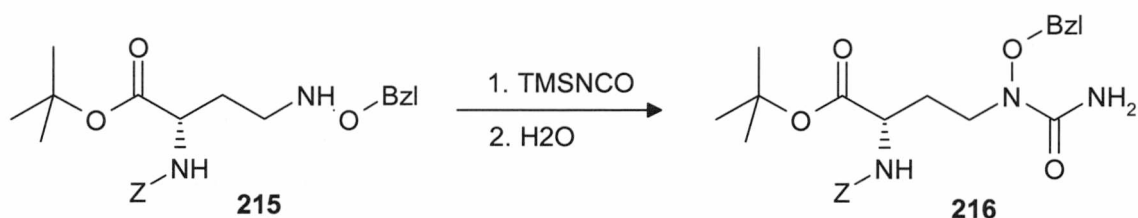


Schemat 3.30.

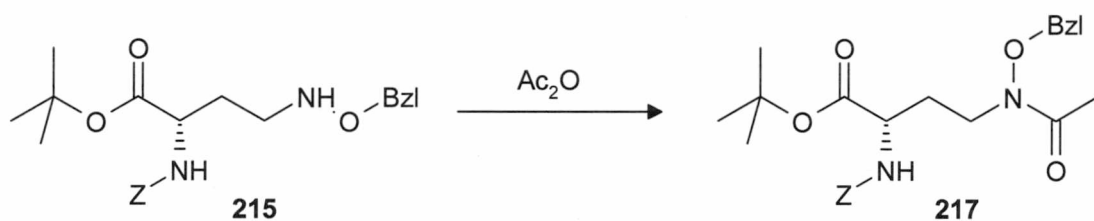
Synteza aldehydu β -asparaginowego z zabezpieczonymi funkcjami karboksylową i aminową nie jest trudna, jednakże składa się z wielu etapów [201]. Substratem, który jest jednocześnie źródłem chiralnego atomu węgla jest kwas L-asparaginowy. W pierwszym etapie otrzymano β -ester monometylowy (**208**), przy użyciu chlorku tionylu w metanolu. Następnie zabezpieczono grupę aminową aminoestru (**208**) acylując ją chloromrówczanem benzylu w obecności słabej zasady jaką jest tlenek magnezu. Kolejno estryfikowano grupę α -karboksylową poprzez reakcję kwasu **209** z izobutylenem w warunkach lekko kwaśnych. W następnym kroku odblokowano grupę β -karboksylową, hydrolizując ester metylowy **210** zasadą sodową. Dalej, przy użyciu chloromrówczanu izobutyłu otrzymano mieszany bezwodnik, który zredukowano borowodorkiem sodu. W ten sposób otrzymano pochodną homoseryny **212** z zablokowanymi funkcjami karboksylową i aminową. Ten związek utleniono metodą Swerna (z zastosowaniem sulfotlenku dimetylu i chlorku oksalilu) otrzymując żądany aldehyd **213**. Pomimo, że metoda otrzymywania tej pochodnej kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego składa się aż z ośmiu etapów, jest ona dosyć wydajna i pozwala na otrzymanie stosunkowo dużej ilości produktu. Wynika to z tego, że większość reakcji zachodzi z dobrymi wydajnościami, a ich produkty można prosto oczyścić.

Otrzymany prekursor **215** posłużył do zsyntezowania szeregu zaprojektowanych analogów. Syntezy te przebiegały w dwóch zasadniczych etapach. W pierwszym kroku hydroksyloaminowy atom wodoru prekursora był podstawiany różnymi funkcjami, a w drugim z otrzymanego związku usuwano grupy zabezpieczające.

Reakcja związku **215** z izocyjanianem trimetylosililowym i następnie hydroliza produktu za pomocą wody dawała pochodną *N*-hydroksymocznikową **216** (Schemat 3.31) [202].



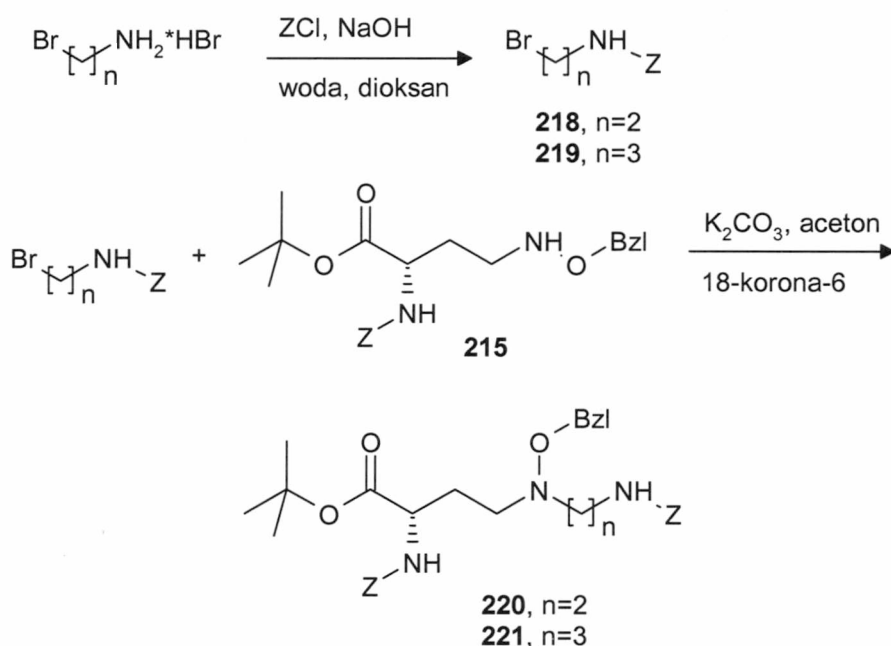
Schemat 3.31.



Schemat 3.31.cd.

Synteza związku z grupą *N*-acetylową była równie prosta. Po około 2h mieszania prekursora z bezwodnikiem octowym otrzymano pożądaný produkt **217** (Schemat 3.31).

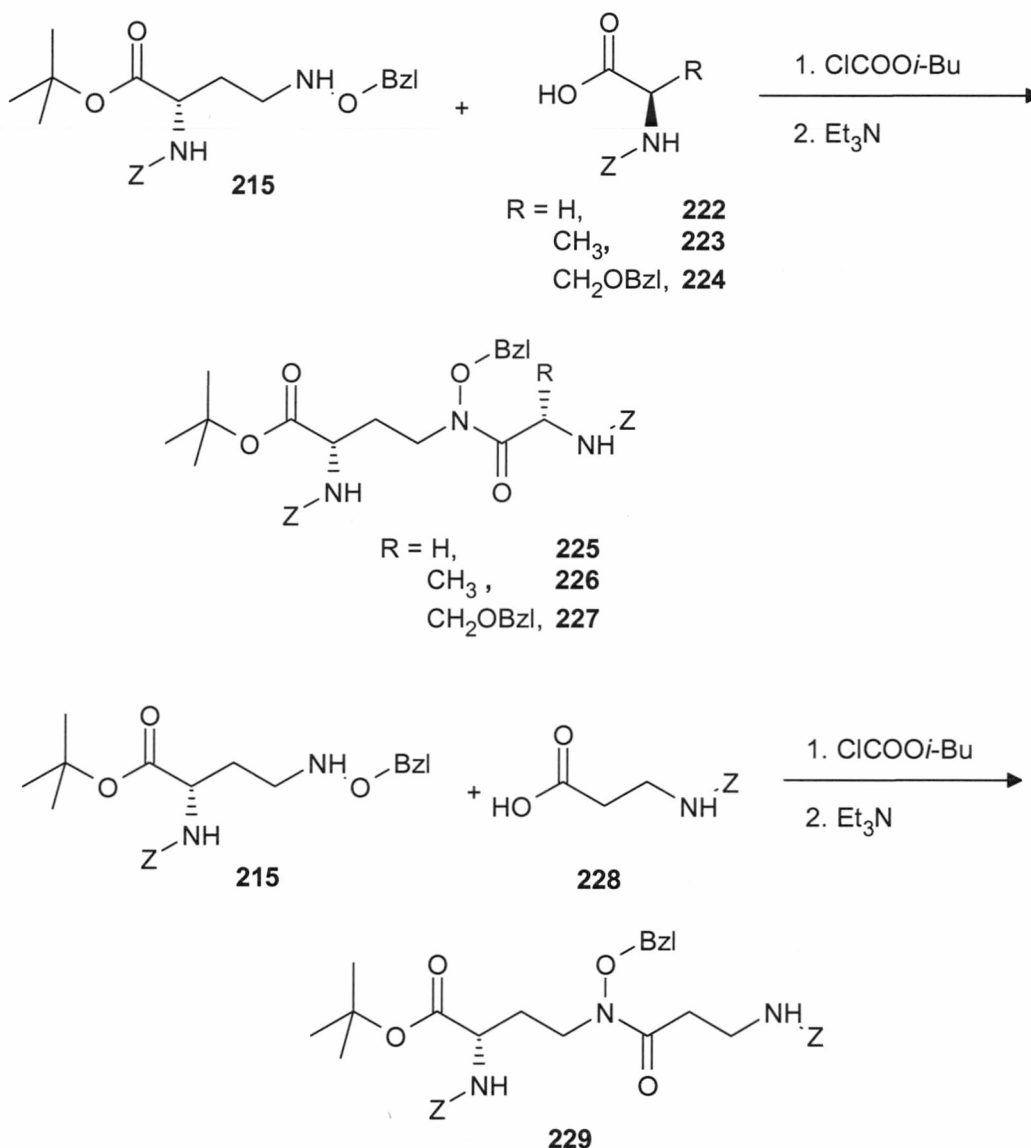
W kolejnych syntezach otrzymano analogi *N*-alkiloaminowe. W pierwszym etapie z bromowodorku 2-bromoetyloaminy i bromowodorku 3-bromopropyloaminy otrzymano pochodne *N*-benzyloksykarbonylowe (odpowiednio **218** i **219**, Schemat 3.32). Następnie przeprowadzono reakcje tych bromopochodnych ze związkiem **215** w acetonie i z użyciem bezwodnego węglanu potasu jako zasady. Pomimo zastosowania katalizatora przeniesienia fazowego, jakim była 18-korona-6, aby otrzymać rozsądne wydajności reakcji, mieszaniny substratów musiały być ogrzewane przez wiele godzin pod chłodnicą zwrotną (około 40-50h).



Schemat 3.32.

Kolejną serię pochodnych otrzymano sprzęgając *N*-blokowane aminokwasy z prekursorem **215** (Schemat 3.33). Do acylowania zastosowano metodę mieszanych bezwodników z użyciem chloromrówczanu izobutyłu. Jako substratu użyto *N*-

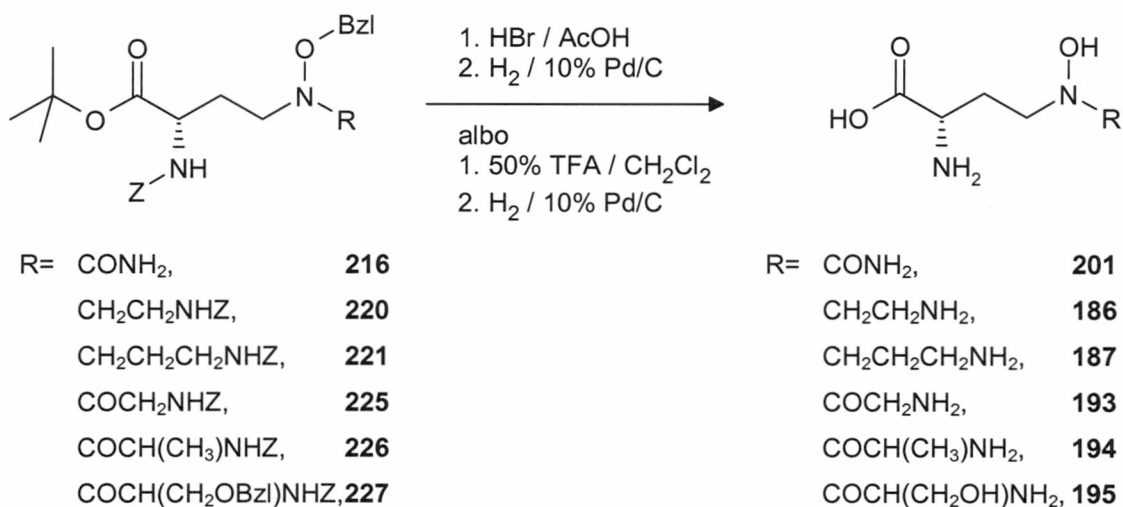
benzyloksykarbonylowych pochodnych α -aminokwasów: glicyny, L-alaniny i *O*-benzylo-L-seryny, oraz β -alaniny. Wydajności reakcji sprzęgania były dobre dla wszystkich zastosowanych pochodnych.



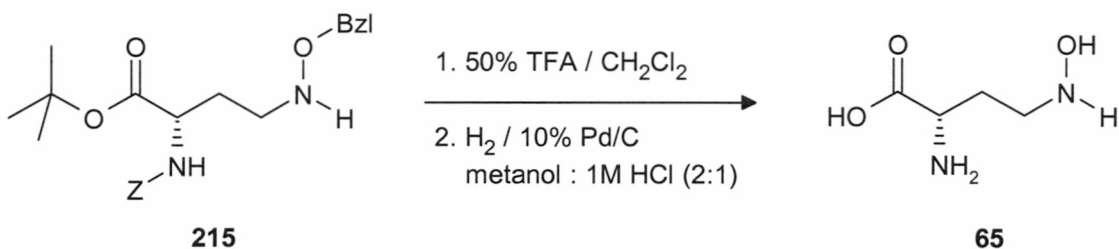
Schemat 3.33.

Drugim etapem było usunięcie grup zabezpieczających. Wszystkie trzy stosowane grupy ochronne, tj.: ester *tert*-butylowy, *N*-benzyloksykarbonyl i *O*-benzyl można stosunkowo łatwo usunąć. Stosowano dwa protokoły odblokowań — w pierwszym grupy *tert*-butylowa i *N*-benzyloksykarbonylowa były usuwane roztworem bromowodoru w kwasie octowym w temperaturze pokojowej a grupa *O*-benzylowa wodorem przy użyciu katalizatora palladowego (10% Pd/C, Schemat 3.34). W drugiej metodzie ester *tert*-butylowy rozkładano 50% roztworem kwasu trifluorooctowego, a

grupy *N*-benzyloksykarbonylową i *O*-benzylową usuwano wodorolitycznie (katalizator 10% Pd/C). Jednakże w przypadku związków: **215**, **225** i **217** dla obu metod odblokowania obserwowano powstawanie niepożądanych produktów redukcji grupy *O*-benzylowej (najprawdopodobniej redukcji grupy hydroksyloaminowej do aminowej) [203]. Ten niekorzystny przebieg reakcji udało się zmienić dla związku **215** stosując mieszaninę 1M kwasu solnego i metanolu jako rozpuszczalnik w reakcji uwodorniania (w stosunku 2:1), która najprawdopodobniej zmniejszała aktywność katalizatora (schemat 3.35) [108].



Schemat 3.34.



Schemat 3.35.

3.8. Aktywność enzymatyczna *in vitro* otrzymanych związków

Potwierdzeniem słuszności założeń przyjętych przy projektowaniu nowych inhibitorów jest ich aktywność inhibitorowa. Przed napisaniem tej pracy udało się dokonać wstępnej oceny otrzymanych związków*. Zestawienie stopnia hamowania syntetazy glutaminy z *E. coli* przedstawiono w Tabeli 3.13. Te wstępne wyniki pokazują, że otrzymane w ramach tej pracy pochodne fosfinotricyny są dobrymi inhibitorami syntetazy glutaminy. Zgodnie z obliczeniami najaktywniejszy jest związek **92**. W przypadku pochodnych kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego rezultaty nie są tak dobre. Opublikowane dane biochemiczne mówią o wysokiej aktywności inhibitorowej związku wiodącego względem enzymów z soi i mózgu owcy. Jednakże aktywność tej substancji względem enzymu bakteryjnego jest niewielka.

Tabela 3.13.

Zestawienie aktywności inhibitorowej badanych związków względem syntetazy glutaminy z *E. coli*. (Reakcja prowadzona przez 30min. w temperaturze 37°C. ‘–’ — brak danych, NA — nie aktywny).

Związek	Stopień hamowania enzymu dla stężenia inhibitora [%]:				
	2.0mmol	0.5mmol	0.1mM	0.05mM	0.01mM
fosfinotricyna	96.4	95.0	85.8	75.1	49.2
92	–	95.8	87.0	78.9	59.0
112	96.2	87.8	81.5	63.4	–
93	95.1	88.3	73.9	52.6	–
(1’RS)- 93	95.6	88.3	71.2	52.2	–
114	95.1	68.5	28.8	18.1	–
165	70.8	30.0	31.0	0.8	–
187	26.2	4.2	2.3	0.9	–
195	15.4	NA	–	–	–
186	9.7	NA	–	–	–
201	7.4	NA	–	–	–
65	4.5	NA	–	–	–
193	NA	NA	–	–	–
194	NA	NA	–	–	–

* Pomiary aktywności inhibitorowej zostały wykonane przez dr Agnieszkę Obojską.

Najprawdopodobniej w tym enzymie nie może zachodzić proces fosforylowania inhibitora przy udziale ATP, który warunkuje wysoką aktywność. Brak znaczącej aktywności związku wiodącego powoduje, że jego pochodne także nie są silnymi inhibitorami. Warto jednak zauważyć, że część z otrzymanych związków (**187, 195, 186, 201**) jest bardziej aktywna niż związek wiodący.

Przedstawione wyniki pokazują, że dostępne obecnie metody projektowania nowych inhibitorów stosunkowo dobrze działają w mało skomplikowanych przypadkach. Jednak wówczas, gdy w miejscu aktywnym enzymu ma zachodzić reakcja z udziałem inhibitora, tego typu analizy nie zawsze dają dobry rezultat.

4. Podsumowanie

W przedstawionej pracy opisano analizę znanych oraz projektowanie i syntezę nowych inhibitorów syntetazy glutaminy. Badania były prowadzone w dwóch kierunkach obejmujących pochodne kwasu aminometylenobisfosfonowego oraz analogi kwasu glutaminowego.

Analiza danych dotyczących serii aminometylenobisfosfonianów umożliwiła lepsze zrozumienie podstaw ich biologicznej aktywności.

- Herbicydowe właściwości tej grupy związków są najprawdopodobniej wynikiem równoczesnego hamowania co najmniej trzech enzymów: syntetazy glutaminy, syntazy DAHP i syntazy FPP.
- Dla ich wysokiej aktywności inhibitorowej kluczowe są elektrostatyczne oddziaływania grupy bisfosfonowej z jonami metalu lub dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi tworzącymi centrum aktywne badanych enzymów.
- Różnicowanie aktywności inhibitorowej serii związków z podstawnikiem aromatycznym względem roślinnej syntetazy glutaminy jest warunkowane przez rozkład potencjału elektrostatycznego w pierścieniu i jego podstawnikach.

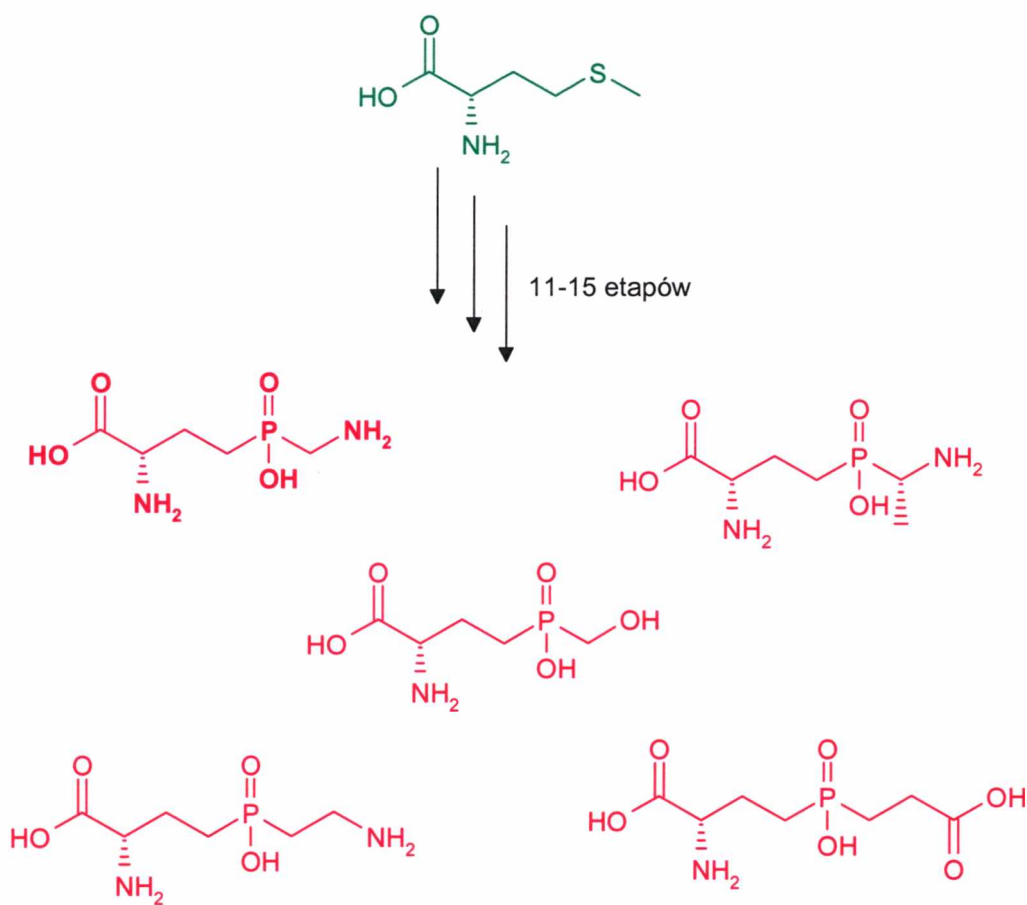
Dokonano analizy sposobu wiązania zbioru znanych inhibitorów — analogów kwasu glutaminowego do centrum aktywnego syntetazy glutaminy.

- Sposób wiązania najsilniejszych inhibitorów syntetazy glutaminy — fosfinotricyny i sulfoksyminy metioniny jest analogiczny do stanu przejściowego reakcji enzymatycznej.
- Nieowracalne wiązanie fosfinotricyny i sulfoksyminy metioniny jest najprawdopodobniej spowodowane nie tylko przez fosforylację, ale także poprzez nietypowe wiązanie wodorowe typu C-H...O z pętlą Glu327.
- Silny inhibitor syntetazy glutaminy musi spełniać dwa warunki: być fosforylowanym po związaniu do wnęki aktywnej i posiadać odpowiedni rozkład ładunku dookoła atomu zastępującego grupę γ -karboksylową glutaminianu.
- Dobra korelacja wyników szeregu funkcji oceniających dla wymodelowanych struktur kompleksów inhibitor-enzym z danymi

eksperymentalnymi potwierdziła poprawność tych struktur oraz użyteczność zastosowanych metodologii.

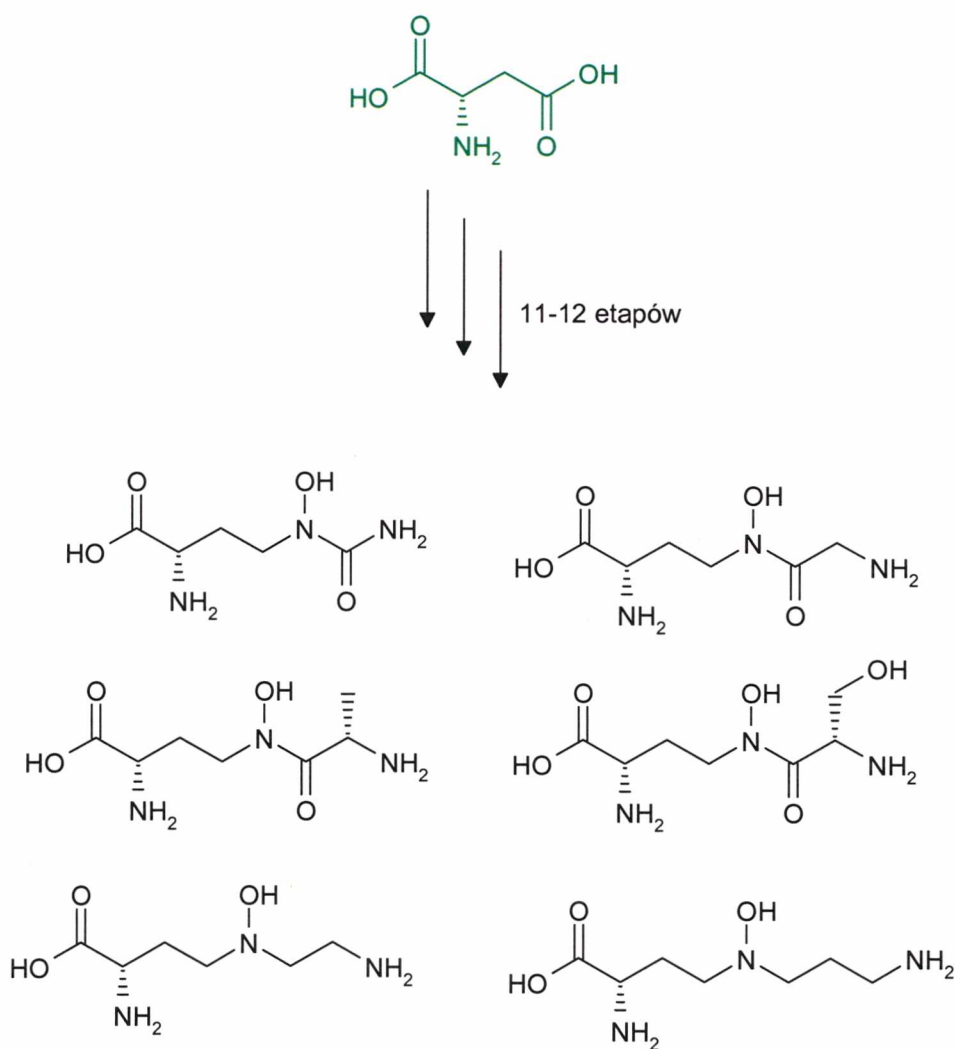
Zaprojektowano i zsyntezowano szereg nowych inhibitorów syntetazy glutaminy.

- Na podstawie wymodelowanych struktur kompleksów fosfinotricyny i kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego z syntetazą glutaminy zaprojektowano zbiór nowych, potencjalnych inhibitorów.
- Wychodząc z L-metioniny otrzymano wybrane enancjomerycznie czyste analogi fosfinotricyny (Schemat 4.1).



Schemat 4.1

- Przy użyciu kwasu L-asparaginowego jako substratu zsyntezowano nowe pochodne kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego w formie pojedynczych stereoizomerów (Schemat 4.2).
- Wstępne pomiary aktywności enzymatycznej wykazały, że otrzymane pochodne fosfinotricyny są bardzo dobrymi inhibitorami bakteryjnej syntetazy glutaminy.
- Otrzymane pochodne kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego wykazują słabą aktywność inhibitorową względem enzymu bakteryjnego, co spowodowane jest słabym działaniem związku wiodącego w stosunku do tego enzymu. Jest to jednak dobry inhibitor roślinnej syntetazy glutaminy. Ponieważ część z przebadanych związków jest bardziej aktywna niż substancja wiodąca, dają one nadzieję na aktywność herbicydową.



Schemat 4.2.

5. Lista publikacji

1. A.Obojska, Ł. Berlicki, P. Kafarski, B. Lejczak, M. Chicca, G. Forlani, Herbicidal Pyridyl Derivatives of Aminomethylene-bisphosphonic Acid Inhibit Plant Glutamine Synthetase, *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, 52, 3337 - 3344.
2. Ł. Berlicki, E. Rudzinska, A. Mucha, P. Kafarski, Cyclodextrins as NMR probes in the study of the enantiomeric compositions of *N*-benzyloxycarbonylamino-phosphonic and phosphinic acids, *Tetrahedron-Asymmetry* **2004**, 15, 1597 - 1602.
3. Ł. Berlicki, Projektowanie związków biologicznie czynnych przy użyciu struktury krystalicznej enzymu, *Na pograniczu chemii i biologii*, tom IX, Wydawnictwo UAM, Poznań **2003**, 59-65.
4. P. Kafarski, J. Grembecka, A. Mucha, M. Pawełczak, M. Drag, Ł. Berlicki, D. Olechnowicz, Projektowanie Potencjalnych Leków i Pestycydów z Wykorzystaniem Wiedzy o Strukturze Przestrzennej Enzymów. *Przemysł Chemiczny* **2003**, 82, 1087-1089.
5. Ł. Berlicki, E. Rudzińska, P. Kafarski, Enantiodifferentiation of aminophosphonic and aminophosphinic acids with α - and β -cyclodextrins, *Tetrahedron-Asymmetry* **2003**, 14, 1535 - 1539.
6. Ł. Berlicki, P. Kafarski, The use of molecular modelling for comparison of three possible modes of action of herbicidally active derivatives of aminomethylene-bisphosphonic acid, *Pest. Biochem. Physiol.* **2002**, 73, 94-103.

Publikacje 1, 4 i 6 są związane bezpośrednio z badaniami prezentowanymi w niniejszej pracy. W pracy 1 zawarte są wyniki analizy CoMFA/3D-QSAR zbioru bisfosfonianów o aktywności inhibitorowej względem syntetazy glutaminy (rozdział 3.2). W publikacji 4 przedstawiono wstępne wyniki projektowania nowych, potencjalnych inhibitorów syntetazy glutaminy w oparciu o strukturę fosfinitricyny (rozdział 3.4). Natomiast praca 6 prezentuje wyniki analizy aktywności herbicydowej bisfosfonianów na poziomie molekularnym (rozdział 3.1).

6. Metody obliczeniowe i eksperyment

6.1. Metody obliczeniowe

Obliczenia były wykonywane przy użyciu pakietów programów: Insight 2000 firmy Accelrys [170], Sybyl 6.9 firmy Tripos [171] i Gaussian 03 [204]. Struktury krystaliczne wszystkich badanych enzymów były pobrane z Brookhaven Protein Data Bank [205].

6.1.1. Analiza sposobu działania herbicydowo aktywnych bisfosfonianów

Struktury krystaliczne syntetazy glutaminy, syntazy pirofosforanu farnezyli i syntazy 3-deoksy-D-arabino-heptulozo-7-fosforanu są dostępne jedynie dla enzymów pochodzących z organizmów innych niż rośliny. Do obliczeń zastosowano następujące struktury: a) syntetazy glutaminy z *Salmonella typhimurium* o rozdzielczości 2.49Å (kod w PDB 1F52) [27]; b) syntazy pirofosforanu farnezyli z *Gallus gallus* (kurczak) skompleksowanej z pirofosforanem geranyli o rozdzielczości 2.5Å (kod w PDB 1UBW) [206]; c) syntazy 3-deoksy-D-arabino-heptulozo-7-fosforanu z *Escherichia coli* skompleksowanej z kwasem fosfo-enolopirogronowym i jonem Pb^{2+} o rozdzielczości 2.6Å (kod w PDB 1QR7) [207-209]. Atomy wodoru zostały dodane przy użyciu programu Insight 2000 a protonacja reszt aminokwasowych została ustalona dla pH=7.0.

W celu wykazania, że wykonywane obliczenia mogą być korelowane z danymi eksperymentalnymi, sekwencje enzymów użytych do obliczeń i enzymów roślinnych zostały porównane przy pomocy programu ClustalW [166, 167].

Badane bisfosfoniany zostały zadokowane w miejscach aktywnych enzymów poprzez nałożenie odpowiednich grup inhibitora i substratu. Optymalizacja struktury inhibitor-enzym była wykonana przy użyciu programu Discover z pakietu Insight 2000 z polem siłowym CFF97 [172]. Wykorzystano procedurę minimalizacją typu zbieżnego gradientu (*conjugate gradient*). Zastosowano warunki, w których inhibitor oraz reszty aminokwasowe w jego otoczeniu były minimalizowane, natomiast wszystkie pozostałe atomy enzymu były zamrożone. Minimalizację prowadzono aż do spełnienia warunku zmiany energii o 0.01kcal/mol.

6.1.2. Przewidywanie aktywności inhibitorowej

Stałe wiązania (K_i) badanych bisfosfonianów **67** i **72** dla każdego z trzech enzymów były oszacowane przy użyciu empirycznej funkcji oceniającej LUDI_1 [162-164]. Wartość funkcji LUDI_1 jest sumą wartości funkcji, które opisują oddziaływania różnego typu oraz efekty entropowe. W wynikach obliczeń przedstawiono wartości następujących funkcji:

- HB_SCORE — opisuje oddziaływania poprzez wiązanie wodorowe;
- IONIC_SCORE — opisuje oddziaływania jonowe;
- LIPO_SCORE — opisuje oddziaływania lipofilowe.

Wartość pK_i była oszacowana na podstawie równania:

$$pK_i = \text{LUDI_1} / 100.$$

6.1.3. Zastosowanie metod 3-D QSAR / CoMFA

Analiza CoMFA 3D-QSAR została przeprowadzona w module QSAR programu Sybyl6.9.1 z użyciem domyślnych wartości parametrów. Struktury badanych bisfosfonianów zostały zbudowane przy użyciu programu Sybyl i zoptymalizowane w próżni. Minimalizację przeprowadzono przy użyciu pola siłowego Tripos i metody zbieżnego gradientu aż do spełnienia warunku zmiany energii o 0.001kcal/mol. Ładunek każdego atomu w zminimalizowanych strukturach został obliczony przy pomocy metody Gasteigera. Zoptymalizowane struktury badanych związków zostały nałożone na strukturę najbardziej aktywnego inhibitora — związku **86**. Zbiór zoptymalizowanych i nałożonych na siebie struktur był użyty do otrzymania wartości pola molekularnego na prostokątnej sieci punktów. Wyniki przedstawiono jako izopowierzchnie wartości lioczynu standardowego odchylenia (StdDev) i wartości pola molekularnego (Coef).

6.1.4. Analiza oddziaływań analogów fosfinotricyny z syntetazą glutaminy

Struktura krystaliczna kompleksu fosfinotricyna-syntetaza glutaminy z *S. typhimurium* (kod w PDB 1F52) była użyta jako punkt startowy we wszystkich obliczeniach [27]. Atomy wodoru były dodane przy użyciu programu Insight 2000 i założeniu protonacji reszt aminokwasowych dla pH=7.0. Atomy manganu zostały zamienione na atomy magnezu z powodu braku parametrów opisujących jony manganu w użytym polu siłowym (oba jony można traktować jako wymienne gdyż dane biochemiczne mówią, że aktywność enzymu nie zmienia się znacząco po takiej

wymianie) [14]. Wszystkie obliczenia za pomocą mechaniki molekularnej wykonano przy wykorzystaniu programu Discover z polem siłowym CFF97 i przy użyciu metody zbieżnego gradientu (*conjugate gradient*). Minimalizacje prowadzono aż do spełnienia warunku zmiany energii mniejszej niż 0.02kcal/mol. W celu otrzymania struktur startowych kompleksów inhibitor-enzym do obliczeń, fosfinotricyna w kompleksie PPT-GS była modyfikowana w taki sposób, aby otrzymać żądany inhibitor. Modyfikacje te zostały wykonane w module Builder pakietu Insight 2000. Struktury inhibitor-enzym były minimalizowane w dwóch krokach. W pierwszym kroku zoptymalizowano pozycje atomów wodoru, w drugim inhibitor i pozycje wszystkich atomów reszt aminokwasowych tworzących miejsce aktywne i inhibitor. W przypadku kompleksów fosfinotricyny w konformacji A i sulfoksyminy metioniny z enzymem zastosowano więzy odległości pomiędzy atomem tlenu grupy karboksylowej reszty Glu327 i atomem węgla grupy metylowej (3.5Å) inhibitora, tak aby zachować odległość pomiędzy tymi atomami obserwowaną w strukturach krystalicznych tych kompleksów.

Struktury inhibitor-enzym były oceniane funkcjami LUDI_1, LUDI_2 i LUDI_3 z programu LUDI z pakietu Insight 2000 [170] oraz funkcjami D_SCORE, PMF_SCORE, G_SCORE, CHEMSCORE, F_SCORE z pakietu Sybyl [171]. Ocena oddziaływań poszczególnych reszt aminokwasowych z inhibitorem (SCORE_Arg, SCORE_Glu, SCORE_n2) została obliczona poprzez zsumowanie wartości funkcji HB_SCORE i IONIC_SCORE z funkcji LUDI_1 w przypadku, kiedy tylko pojedyncza reszta aminokwasowa została wprowadzona do obliczeń jako białko.

Kwantowo-mechaniczne obliczenia *ab initio* rozkładu potencjału elektrostatycznego ($\Phi(r)$) i rozkładu ładunku ($\rho(r)$) zostały wykonane z wykorzystaniem programu Gaussian 03 [204]. Zastosowano metodę B3LYP ze zbiorem funkcji bazowych 6-31++G(d,p). Do obliczeń użyto struktur związków znalezionych w obliczeniach struktur kompleksów inhibitor-enzym przy pomocy mechaniki molekularnej. Rysunki 3.11 i 3.12 zostały przygotowane przy użyciu skryptu [210] w wykorzystującym bibliotekę The Visualisation Toolkit [211], poprzez mapowanie potencjału elektrostatycznego ($\Phi(r)$) na izopowierzchnie ładunku o wartości $0.01e/a_0^3$.

6.1.5. Projektowanie nowych, potencjalnych inhibitorów syntetazy glutaminy

Do projektowania inhibitorów syntetazy glutaminy użyto program LUDI z pakietu Insight 2000 [170], przy użyciu stacji graficznych Silicon Graphics O2, Onyx lub Origin. Do obliczeń użyto struktur kompleksów fosfinotricyny w konformacji A

albo kwasu 4-*N*-hydroksy-4-*N*-metylo-2,4-diaminomasłowego (**182**) albo kwasu 4-*N*-acetoksy-4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego (**183**) z syntetazą glutaminy. Struktury kompleksów **182** i **183** z enzymem otrzymano dodając odpowiednio grupę metylową lub acetylową do struktury kwasu 4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowego (**65**) w kompleksie z GS przy użyciu modułu Builder pakietu Insight 2000. Kompleksy te zoptymalizowano wg protokołu opisanego w rozdziale 5.1.4. Program LUDI uruchamiano w trybie połączeń (*Link mode*), w którym przeszukiwana jest baza danych fragmentów (około 1160 fragmentów), które były dopasowywane do inhibitora wiodącego. Fragmenty te były przyłączane do grupy metylowej fosfinotricyny albo związków **182** lub **183**, będącej centrum sfery przeszukiwania. W programie wykorzystywano szereg parametrów, których opis i stosowane wartości przedstawiono w Tabeli 5.1.

Struktury kompleksów otrzymane przy pomocy programu LUDI były dodatkowo zoptymalizowane. Minimalizację przeprowadzono przy użyciu programu Discover z polem siłowym cff97. W minimalizacji zastosowano warunki, w których tylko reszty tworzące centrum aktywne enzymu i inhibitor były wolne, natomiast pozostała część enzymu była zamrożona. Stosowano procedurę minimalizacji typu zbieżnego gradientu (*conjugate gradient*). Obliczenia prowadzono aż do spełnienia warunku zmiany energii mniejszej niż 0.01kcal/mol. Zoptymalizowaną strukturę kompleksu enzym-inhibitor ponownie oceniano przy pomocy funkcji LUDI_1.

Tabela 5.1.

Kluczowe parametry programu LUDI używane podczas projektowania inhibitorów.

Parametr	Stosowany zakres zmienności	Opis
<i>Linkage</i>	<i>One</i>	Liczba wiązań pomiędzy inhibitorem wiodącym a nowym fragmentem
<i>Max_Alignment_Angle</i>	14.0	Maksymalny kąt odchylenia fragmentu od położenia optymalnego
<i>Max_RMS</i>	0.4 — 0.6	Maksymalne odchylenie pozycji nowego fragmentu od ułożenia najbardziej optymalnego
<i>Rotatable_Bonds</i>	<i>Two_At_A_Time</i>	Ilość wiązań, które będą obracane podczas dopasowywania nowego fragmentu.
<i>Center of search</i>	Współrzędne atomu węgla do którego przyłączano nowe fragmenty	Środek sfery zawierającej obszar, w którym dopasowywano nowy fragment.
<i>Radius [Å]</i>	6 — 10	Promień sfery poszukiwania
<i>Library</i>	<i>Biosym</i>	Zastosowana biblioteka fragmentów
<i>Min_Separation</i>	3.0	Parametr określający minimalną odległość na jaką mogą być zbliżone atomy węgla nowego fragmentu i receptora. Na podstawie tego parametru skalowane są inne dopuszczalne odległości pomiędzy atomami.
<i>Electrostatic_Check</i>	<i>On</i>	Wskazuje, czy program ma sprawdzać oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy polarnymi grupami.
<i>Link_Weight</i>	1.0	Wzajemne wagi dopasowania nowego fragmentu do: inhibitora wiodącego (<i>Link_Weight</i>), miejsc oddziaływania typu lipofilowego (<i>Lipo_Weight</i>) i wiązań wodorowych (<i>H_Bond_Weight</i>).
<i>Lipo_Weight</i>	1.0	
<i>H_Bond_Weight</i>	1.0	
<i>No_Unpaired_Polar</i>	<i>Yes</i>	Wskazuje czy w nowym fragmencie może znaleźć się grupa polarna, która nie oddziałuje korzystnie z receptorem.
<i>Reject_Bifurcated</i>	<i>No</i>	Wskazuje, czy odrzucane będą 'rozdwojone' wiązania wodorowe.
<i>Scoring_Function</i>	<i>Energy_Estimate</i>	Funkcja oceniająca oddziaływania nowych fragmentów z receptorem.
<i>Search_Type</i>	<i>Fast</i>	Sposób przeszukiwania bazy danych fragmentów.

6.2. Eksperyment

6.2.1. Odczynniki

Rozpuszczalniki pochodziły z POCh i miały stopień czystości cz.d.a. lub były dodatkowo oczyszczane (z wyjątkiem etanolu, który był skażony eterem dietylowym). Dichlorometan destylowano znad P_2O_5 , tetrahydrofuran znad metalicznego sodu (do roztworu dodawano benzofenonu i początkowo ogrzewano do otrzymania granatowego zabarwienia), eter dietylowy destylowano znad metalicznego sodu. Azot pochodził z firmy Air Products, Kędzierzyn Koźle, Polska i miał czystość 5.0. Pozostałe odczynniki pochodziły z firm: Sigma-Aldrich-Fluka, Lancaster lub POCh.

W przypadku wykonywania chromatografii kolumnowej używano żelu krzemionkowego typu 60 (60-230mesh) firmy Fluka. Dla potrzeb chromatografii cienkowarstwowej używano płytek polietylenowych z naniesioną warstwą żelu krzemionkowego typu 60 (60-230mesh) z indykatorem fluoryzującym przy fali długości 254nm, pochodzących firmy Fluka. Wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) wykonywano używając aparatu ProStar model 210 firmy Varian Ltd. Używano detektora pracującego przy dwóch długościach fali: 220nm i 254nm. Wykorzystywano kolumnę Dynamax 250mm*21.4mm wypełnioną sorbentem Microsorb 300-10 C18. Dla potrzeb chromatografii HPLC używano acetonitrylu o czystości 'do HPLC' z firmy POCh oraz wody oczyszczonej za pomocą aparatu EASY PURE II — Ultra Pure Water System, firmy Barnstead Ltd.

5.2.2. Analiza

Temperatury topnienia mierzono przy pomocy aparatu Boetiusa i nie były one korygowane. Skręcalność optyczną mierzono przy użyciu aparatu polAAr 31 firmy Optical Activity Ltd, przy długości fali 589nm w temperaturze 25°C.

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) wykonano na aparacie AVANCE DRX 300 firmy Bruker, który działa przy podstawowych częstotliwościach: 300.13MHz (1H), 75.48MHz (^{13}C) i 121.51MHz (^{31}P). Próbkki były przygotowane w rozpuszczalnikach: $CDCl_3$ (99.5% D, stabilizowany metalicznym srebrem), D_2O (99.8% D) z firmy ARMAR Chemicals AG, Döttingen, Szwajcaria. Pomiary wykonywano w temperaturze 300K. Tetrametylosilan był używany jako standard dla widm protonowych i węglowych, natomiast w przypadku widm fosforowych był to 85% kwas fosforowy. Widma masowe (*electrospray*) rejestrowano przy użyciu aparatu Finnigan MAT TSQ 700.

5.2.3. Preparatyka

5.2.3.1. Synteza analogów fosfinotricyny

Kwas (4'S)-3-(3'-benzyloksykarbonylo-1',3'-oksazolidyn-5'-on-4'-ylo)propanowy (117). Kwas *N*-benzyloksykarbonyloglutaminowy (15.0g, 53.4mmol), kwas *p*-toluenosulfonowy (0.6g) i paraformaldehyd (2.7g, 90mmol) rozpuszczono w 240ml benzenu. Całość ogrzewano do wrzenia pod nasadką azeotropową przez 7h. Mieszaninę reakcyjną przemyto wodą (dwa razy 100 ml) i następnie ekstrahowano nasyconym roztworem NaHCO₃ (trzy razy 100 ml). Połączone roztwory wodne zakwaszono 5% kwasem solnym do odczynu kwaśnego a wydzielony produkt ekstrahowano octanem etylu (pięć razy 80ml). Połączone frakcje organiczne suszono nad bezwodnym MgSO₄ i po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 13.0g produktu (83%). ¹H NMR (CDCl₃): 2.0-2.3 (m, 2H, CHCH₂), 2.3-2.5 (m, 2H, CH₂COOH), 4.40 (t, J=5.4Hz, 1H, CH), 5.10 (s, 2H, CH₂Ph), 5.13, 5.44 (s+s, 2H, OCH₂N), 7.36 (s, 5H, C₆H₅), 10.2 (bs, 1H, COOH).

(4S)-3-benzyloksykarbonylo-4-(2-jodoetylo)-1,3-oksazolidyn-5-on (120). Związek 117 (2.4g, 8.3mmol) rozpuszczono w suchym chlorku metylenu (70ml), dodano chlorek oksalilu (0.8ml, 1.16g, 9.1mmol) i 2 krople DMF. Całość mieszano w atmosferze azotu przez 1h. Następnie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. W 50ml suchego dichlorometanu rozpuszczono sól sodową *N*-tlenku 2-merkaptopirydyny (1.5g, 10.1mmol), 2,2,2-trifluorjodoetan (7.5g, 35.7mmol) i *N,N*-dimetyloaminopirydynę (65mg). Całość ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w atmosferze azotu. Roztwór wcześniej otrzymanego chlorku kwasowego w 30ml dichlorometanu wkraplano do ogrzewanej mieszaniny. Kolbę reakcyjną oświetlano dwoma lampami wolframowymi o łącznej mocy 300W. Reakcję prowadzono przez 1h. Następnie mieszanina reakcyjna była przemywana kolejno: wodą (50ml), stężonym kwasem solnym (25ml) i wodą (50ml). Rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem a powstały olej poddano chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, dichlorometan). Otrzymano 0.65g (21%) produktu. ¹H NMR (CDCl₃): 2.42 (m, 2H, CH₂CH₂I), 3.19 (t, J=7.3Hz, 2H, CH₂I), 4.35 (t, J=6.0Hz, 1H, CH), 5.18 (s, 2H, CH₂Ph), 5.27, 5.53 (s+s, 2H, OCH₂N), 7.36 (s, 5H, C₆H₅).

Lakton L-homoseryny (124). L-Metionina (43.7g, 0.293mol) była rozpuszczona w 840ml wody. Do tego roztworu dodano 120ml metanolu i 100g (0.7mol) jodku metylu. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 48h. Następnie odparowano

rozpuszczalnik i jodek metylu do ok. 1/3 objętości. Roztwór uzupełniono wodą do objętości 500ml i dodano 24.6g (0.293mol) NaHCO_3 i gotowano pod chłodnicą zwrotną przez 15h. Następnie wodę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Kolejno dodano 550ml 6M kwasu solnego i 15ml 30% roztworu H_2O_2 . Powstały jod ekstrahowano eterem dietylowym (trzy razy 150ml). Warstwę wodną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 1h i następnie usunięto wodę pod zmniejszonym ciśnieniem. Aby oddzielić powstały lakton homoseryny od chlorku sodu, powstały osad ekstrahowano w systemie ciągłym przez 12h przy pomocy etanolu. Z otrzymanego roztworu usunięto etanol (pod zmniejszonym ciśnieniem) i dodano 600ml 6M kwasu solnego. Całość ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 1h. Następnie rozpuszczalnik odparowano a produkt przekrystalizowano z mieszaniny etanol/woda (9/1). Otrzymano 18.35g (45%) produktu. $[\alpha]_D = -21.4^\circ$ ($c=1.28$, woda). ^1H NMR (D_2O): 2.31-2.47, 2.70-2.81 (m, 2H, CH_2CH), 4.34-4.45 (m, 2H, CH_2O), 4.58 (t, $J=9.3\text{Hz}$, 1H, CHNH_2).

Bromowodorek kwasu (2S)-2-amino-3-bromomasłowego (125). Do 40ml 30% HBr w kwasie octowym dodano lakton L-homoseryny (3.5g). Całość zamknięto w butelce i ogrzewano do 100°C przez 5.5h. Następnie zostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Kolejnego dnia odsączono powstały osad i przemyto go eterem dietylowym. Otrzymano 4.5g (75%) Produktu. ^1H NMR (D_2O): 2.20-2.32, 2.37-2.49 (m+m, 1H+1H, CHCH_2), 3.48 (m, 2H, CH_2Br), 4.11 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 1H, CH). ^{13}C NMR (D_2O): 28.0 (CHCH_2), 32.7 (CH_2Br), 51.4 (CH), 171.2 (COOH).

Chlorowodorek estru metylowego kwasu (2S)-2-amino-3-bromomasłowego (126). Związek **125** (20.3g, 77.2mmol) rozpuszczono w metanolu i przez otrzymany roztwór przepuszczono suchy HCl (osuszony w płuczce z stężonym kwasem siarkowym). Reakcję prowadzono przez 2h a ilość HCl regulowano tak, aby temperatura roztworu nie przekroczyła 40°C . Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Osad dwukrotnie rozpuszczano w metanolu i odparowywano. Otrzymany produkt suszono przez noc w eksykatorze próżniowym nad NaOH. Otrzymano 15.9g produktu (89%). ^1H NMR (D_2O): 2.38-2.47, 2.52-2.64 (m+m, 1H+1H, CHCH_2), 3.61 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 2H, CH_2Br), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 4.35 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 1h, CH). ^{13}C NMR (D_2O): 28.0 (CHCH_2), 32.7 (CH_2Br), 51.5 (CH), 54.0 (OCH_3), 169.9 (COOH).

Ester metylowy kwasu (2S)-N-benzyluksykarbonylo-2-amino-3-bromomasłowego (127). Związek **126** (15g, 64.5mmol) rozpuszczono w 130ml wody i ochłodzono do temperatury 0°C . Następnie dodano NaHCO_3 (13g, 155mmol) i chloromrówczan

benzylu (13.2g, 77.5mmol). Całość mieszano przez 1.5h powoli ogrzewając do temperatury pokojowej. Następnie produkt ekstrahowano eterem dietylowym (dwa razy 120ml). Połączone frakcje organiczne suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany produkt krystalizowano z mieszaniny heksan/eter dietylowy. Otrzymano 12.4g produktu (58%). ^1H NMR (CDCl_3): 2.17-2.26, 2.37-2.44 (m+m, 1H+1H, CHCH_2), 3.39 (t, $J=6.9\text{Hz}$, 2H, CH_2Br), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 4.47 (dt, $J=7.4\text{Hz}$, $J=5.0\text{Hz}$, CH), 5.09 (s, 2H, PhCH_2), 5.49 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H, NH), 7.33 (m, 5H, C_6H_5). ^{13}C NMR (CDCl_3): 28.1 (CHCH_2), 35.6 (CH_2Br), 52.7, 52.8 (CH, OCH_3), 67.2 (PhCH_2O), 128.1, 128.3, 128.6, 136.0 (C_6H_5), 155.9 (PhCH_2OCO), 172.0 (COOMe).

Ester metylowy kwasu (2S)-N-benzyloksykarbonylo-2-amino-3-jodo-masłowego (128). Związek **127** (12.3g 32.6mmol) rozpuszczono w acetonie (50ml) i do roztworu dodano jodek sodu (7.4g, 49.4mmol). Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 24h. Następnie odsączono powstały osad bromku sodu i dodano kolejną porcję jodku sodu (7.4g, 49.4mmol). Po tym czasie odsączono osad i roztwór odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano 50ml wody i 50ml eteru dietylowego. Po rozpuszczeniu osadu warstwę wodną odrzucono. Warstwę eterową przemyto 5% roztworem tiosiarczanu sodu i wodą i następnie wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt przekrystalizowano z eteru naftowego. Otrzymano 10.55g produktu (86%). $[\alpha]_{\text{D}} = +11.0^\circ$ ($c=2.4$, CHCl_3); t.t.=68-72°C; ^1H NMR (CDCl_3): 2.14-2.21, 2.37-2.44 (m+m, 1H+1H, CHCH_2), 3.13 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H, CH_2I), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 4.40 (dt, $J=5.0\text{Hz}$, $J=5.0\text{Hz}$, 1H, CH), 5.09 (s, 2H, PhCH_2), 5.44 (d, $J=5.3\text{Hz}$, 1H, NH), 7.33 (m, 5H, C_6H_5). ^{13}C NMR (CDCl_3): 36.8 (CHCH_2), 52.7, 52.8 (CH, OCH_3), 54.7 (CH_2I), 67.2 (PhCH_2O), 128.1, 128.3, 128.6, 136.0 (C_6H_5), 155.9 (PhCH_2OCO), 171.7 (COOMe).

Kwas hydroksymetylofosfinowy (130). Do 10g 50% roztworu kwasu podfosforowego (76mmol) dodano 7.8ml 30% roztworu formaldehydu (78mmol). Całość ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 25min. Następnie odparowano wodę pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 7.3g mieszaniny, która zawierała 90% kwasu hydroksymetylenofosfinowego (**130**) i 10% kwasu bis(hydroksymetyleno)fosfinowego (**131**). Kwas hydroksymetylenofosfinowy (**130**): ^1H NMR (D_2O): 3.38 (d, $J=5.3\text{Hz}$, 2H, CH_2), 6.54 (d, $J=552\text{Hz}$, 1H, PH); ^{31}P NMR (D_2O): 31.4; kwas

bis(hydroksymetyleno)fosfinowy (**131**): ^1H NMR (D_2O): 3.46 (d, $J=5.0\text{Hz}$, 4H, 2^*CH_2); ^{31}P NMR (D_2O): 46.2.

Ester metylowy kwasu podfosforawego (132). Z 13.2g (100mmol) 50% handlowego kwasu podfosforawego usunięto wodę pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50°C . Otrzymany kwas rozpuszczono w mieszaninie bezwodnych THF (24ml) i toluenu (24ml). Roztwór ochłodzono od ok. 5°C i dodano ortomrówczanu metylowego (44ml). Całość pozostawiono do powolnego ogrzania do temperatury pokojowej i mieszano jeszcze przez noc. Otrzymany 1M roztwór używano do dalszych syntez. ^{31}P NMR (CDCl_3): 18.4, ^{31}P NMR {1H} (CDCl_3): 18.4 (tq, $^1J_{\text{PH}}=566\text{Hz}$, $^3J_{\text{PH}}=12.7\text{Hz}$).

Ester metylowy kwasu *N*-difenylometrylenoaminometanofosfinowego (134). Do 20ml (200mmol) 30% roztworu formaldehydu w wodzie dodano 9.7g (53mmol) difenylometrylenoaminy i 0.2g KOH. Całość ogrzewano do temperatury 85°C silnie mieszając przez 2h. Powstały osad odsączono. Surową triazynę przekrystalizowano z toluenu. Otrzymano 7.5g triazyny. Całość otrzymanej triazyny (12.8mmol) dodano do 35ml (35mmol) 1M roztworu estru metylowego kwasu podfosforawego. Do tej mieszaniny dodano również 60ml metanolu. Całość ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 8h. Następnie usunięto rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 10.8g surowego produktu. ^1H NMR (CDCl_3): 2.95 (d, $J=11.4\text{Hz}$, 3H, CH_3), 3.75 (d, $J=12\text{Hz}$, 2H, CH_2P), 4.84 (s, 1H, Ph_2CH), 7.06 (d, $J=549\text{Hz}$, 1H, PH), 7.11-7.37 (m, 10H, $2^*\text{C}_6\text{H}_5$); ^{31}P NMR (CDCl_3): 39.1; ^{31}P NMR {1H} (CDCl_3): 39.1 (dublet sekstetów, $^1J_{\text{PH}}=546\text{Hz}$, $^3J_{\text{PH}}=11.5\text{Hz}$).

Chlorowodorek kwasu aminometanofosfinowego (135). Do 10.8g związku **134** dodano 100ml stężonego kwasu solnego. Mieszaninę ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 12h. Następnie odparowano kwas pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano 30ml wody i 30ml eteru dietylowego. Mieszaninę przesączono i warstwę eterową odrzucono. Warstwę wodną przemyto jeszcze eterem dietylowym (dwa razy 20ml). Z otrzymanego roztworu wodnego usunięto wodę pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 4.0g produktu (87% z estru emtylowego kwasu podfosforawego). ^1H NMR (D_2O): 2.84 (d, $J=16.6\text{Hz}$, 2H, CH_2), 6.98 (d, $J=549\text{Hz}$, 1H, PH); ^{31}P NMR (D_2O): 16.7.

Kwas *N*-benzyloksykarbonyloaminometanofosfinowy (136). Związek **135** (3.0g, 23mmol) rozpuszczono w 40ml wody i dodano 4M roztworu NaOH do uzyskania $\text{pH}=10$. Następnie dodano 20ml dioksanu i 4.3ml (5.1g, 30mmol) chloromrówczanu

benzylu. Całość mieszano przez 3h utrzymując pH roztworu w pobliżu 10 przez dodawanie 4M roztworu NaOH i roztwór mieszano przez noc. Następnego dnia rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do suchej pozostałości dodano wody i przemyto eterem dietylowym (30ml). Warstwę wodną zakwaszono 3M kwasem solnym do pH=2 i ekstrahowano wydzielony produkt octanem etylu (trzy razy 50ml). Połączone warstwy organiczne suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 3.0g produktu (56%). T.t.=71-73°C; ^1H NMR (D_2O): 3.10 (d, $J=9.8\text{Hz}$, 2H, CH_2P), 4.98 (s, 2H, PhCH_2), 6.79 (d, $J=523\text{Hz}$, 1H, PH), 7.14-7.29 (m, 5H, C_6H_5); ^{31}P NMR (D_2O): 22.9;

Kwas 1-(*N*-difenylometyleno)aminoetanofosfinowy (137). Chlorowodorek difenylometylenoaminy (12g, 55mmol) rozpuszczono w 20ml wody. Do roztworu dodano 5.61ml (55mmol) 50% roztworu kwasu podfosforawego. Całość doprowadzono do wrzenia pod chłodnicą zwrotną i powoli wkraplało roztwór acetaldehydu (2.42g, 55mmol) w 15ml wody. Następnie roztwór ogrzewano jeszcze przez 3h. Po ochłodzeniu produkt odsączono przemywając niewielką ilością eteru dietylowego. Otrzymano 10.8g produktu (71%). ^1H NMR (D_2O): 0.76 (dd, $J_{\text{PH}}=17.2\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=6.9\text{Hz}$, 3H, CH_3), 2.16 (dq, $J_{\text{PH}}=10.9\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=7.0\text{Hz}$, 1H, CH), 4.55 (s, 1H, CHPh_2), 6.48 (d, $J_{\text{PH}}=506\text{Hz}$, 1H, PH), 6.51 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 1H+1H, 2* *p*-Ph), 6.61 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H+2H, 2* *m*-Ph), 6.83 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 2H+2H, 2* *o*-Ph); ^{31}P NMR (D_2O): 32.0.

Kwas 1-aminoetanofosfinowy (138). Do związku 137 (10.8g, 39mmol) dodano 100ml stężonego kwasu solnego i gotowano pod chłodnicą zwrotną przez 12h. Następnie odparowano kwas pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w etanolu i znowu odparowano. Suchą pozostałość rozpuszczono w wodzie i przemyto chloroformem (dwa razy 40ml). Następnie odparowano wodę a osad rozpuszczono w etanolu. Do roztworu dodano kroplami tlenek propylenu do odczynu kwaśnego. Roztwór pozostawiono na noc. Wytrącony osad odsączono. Otrzymano 2.5g produktu (59%). ^1H NMR (D_2O): 1.24 (dd, $J_{\text{PH}}=19.9\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=7.3\text{Hz}$, 3H, CH_3), 3.16 (dq, $J_{\text{PH}}=8.5\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=7.4\text{Hz}$, 1H, CH), 6.87 (d, $J_{\text{PH}}=534\text{Hz}$, 1H, PH); ^{31}P NMR (D_2O): 23.4.

Kwas *N*-benzyloksykarbonylo-1-aminoetanofosfinowy (139). Związek otrzymano analogicznie do związku 136 używając 2.5g (23mmol) związku 138 i 4.0g (23.5mmol) chloromrówczanu benzylu. Otrzymano 3.35g produktu (60%). T.t.=95-100°C ^1H NMR (D_2O): 1.03 (dd, $J_{\text{PH}}=15.4\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=7.4\text{Hz}$, 3H, CH_3), 3.43 (dt, $J_{\text{PH}}=15.6\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=7.6\text{Hz}$,

1H, *CHP*), 4.93 (s, 2H, PhCH_2), 6.58 (d, $J=517\text{Hz}$, 1H, *PH*), 7.23 (m, 5H, C_6H_5); ^{31}P NMR (D_2O): 28.1.

Kwas (1*S*)-*N*-benzyloksykarbonylo-1-aminoetanofosfinowy ((*S*)-139). (–)Metylobenzyloaminę (1.27g, 10.5mmol) rozpuszczono w 7ml etanolu. Roztwór ten dodano do ogrzewanego do wrzenia pod chłodnicą zwrotną roztworu **139** (2.55g, 10.5mmol) w etanolu (42ml). Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i powstałą sól krystalizowano z octanu etylu. Skład enancjomeryczny mieszaniny po każdej krystalizacji był kontrolowany przy pomocy spektroskopii NMR. Wykonywano widmo ^{31}P NMR roztworu 10mM badanej soli i 100mM α -cyklodextryny. Po pięciu krystalizacjach otrzymano produkt enancjomerycznie czysty (1.10g soli). Otrzymany produkt rozpuszczono w 20ml wody i dodano 4M roztworu NaOH celem osiągnięcia odczynu zasadowego. Wydzieloną aminę odmyto eterem dietylowym (dwa razy 15ml). Roztwór wodny zakwaszono 2M kwasem solnym a wydzielony produkt ekstrahowano octanem etylu (trzy razy 30ml). Połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Po odsączeniu środka suszającego rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 0.7g produktu (27%). $[\alpha]_{\text{D}}=+17.4^\circ$ ($c=2.75$, octan etylu).

Kwas 2-karbamoiloetanofosfinowy (141). Do $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ (2.5g, 30mmol) dodano 8ml heksametylodisilazanu i tą mieszaninę ogrzewano do ok. 100°C w atmosferze azotu przez 1.5h. Następnie roztwór ochłodzono do 0°C i dodano roztwór 1.6g (22.5mmol) akrylamidu w 40ml suchego dichlorometanu. Całość mieszano przez noc w temperaturze pokojowej (w atmosferze azotu). Następnego dnia roztwór przesączono, dodano 10ml metanolu i mieszano przez 1h. Po odparowaniu rozpuszczalników pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymano 2.9g produktu (93%). T.t.= $170\text{--}174^\circ\text{C}$; ^1H NMR (D_2O): 1.83 (dt, $J_{\text{PH}}=11.2\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=6.3\text{Hz}$, 2H, CH_2P), 2.35 (dt, $J_{\text{PH}}=12.5\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=6.1\text{Hz}$, 2H, CH_2CONH_2), 6.90 (d, $J=555\text{Hz}$, *PH*); ^{31}P NMR (D_2O): 36.2; ^{13}C NMR (D_2O): 24.65 (d, $J=92.3\text{Hz}$, CH_2P), 26.42 (d, $J=2.2\text{Hz}$, CH_2CONH_2), 177.10 (d, $J=13.6\text{Hz}$, CONH_2).

Kwas 2-cyjanoetanofosfinowy (142). Związek otrzymano metodą analogiczną do związku **141** używając akrylonitryl (1.2g, 22.5mmol) zamiast akrylamidu. Otrzymano 2.1g produktu (80%). ^1H NMR (D_2O): 1.85 (dt, $J_{\text{PH}}=14.7\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=6.6\text{Hz}$, 2H, CH_2P), 2.52 (dt, $J_{\text{PH}}=15.3\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=7.6\text{Hz}$, 2H, CH_2CN), 6.90 (d, $J=540\text{Hz}$, 1H, *PH*); ^{31}P NMR (D_2O): 30.1.

Kwas 2-aminoetanofosfinowy (143). W 50ml wody rozpuszczono 5g NaOH (125mmol) i ochłodzono do ok. 0°C. Następnie dodano 1.45ml (4.52g, 28mmol) i ochłodzono roztwór do -15°C. Związek **141** (3.9g, 29.5mmol) rozpuszczono w 5ml wody i roztwór ochłodzono do -15°C i całość dodano w jednej porcji do silnie mieszanego roztworu podbrominu. Całość intensywnie mieszano w temperaturze -15°C przez 2h, a następnie pozostawiono do powolnego ogrzewania i mieszano przez noc. Następnego dnia do roztworu dodano 3M kwasu solnego do osiągnięcia odczynu kwaśnego i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Dodano etanolu rozpuszczając produkt, nierozpuszczalne sole nieorganiczne odsączono. Do etanolowego roztworu dodawano kroplami tlenek propylenu, aż do uzyskania odczynu obojętnego. Całość pozostawiono na noc w temperaturze ok. 4°C. Wytrącony osad produktu odsączono. Otrzymano 2.5g produktu (77%). ¹H NMR (D₂O): 1.82 (dt, J_{PH}=11.3Hz, J_{HH}=6.6Hz, 2H, CH₂P), 3.06 (dt, J_{PH}=9.2Hz, J_{HH}=7.4Hz, 2H, CH₂N), 6.97 (d, J=546Hz, 1H, PH); ³¹P NMR (D₂O): 25.7.

Kwas N-benzylloksykarbonylo-2-aminoetanofosfinowy (144). Związek otrzymano analogicznie do związku **136** używając 1.6g (14mmol) związku **143** i 2.7ml (3.24g, 19mmol) chloromrówczanu benzylu. Otrzymano 1.85g produktu (54%). T.t=60-65°C; ¹H NMR (D₂O): 1.61 (dt, J_{PH}=15Hz, J_{HH}=7.3Hz, 2H, CH₂P), 3.17 (dt, J_{PH}=11.2Hz, J_{HH}=8Hz, 2H, CH₂N), 4.95 (s, 2H, PhCH₂), 6.82 (d, J_{PH}=510Hz, 1H, PH), 7.27 (m, 5H, C₆H₅); ³¹P NMR (D₂O): 27.2.

Kwas (1S,1'R)-N-benzylometylo-1-aminofuranometylenofosfinowy (145). W 10ml izopropanolu rozpuszczono 2.11g (22mmol) furfuralu i 3.5g (20mmol) soli kwasu podfosforawego i (R)-benzylometyloaminy. Całość ogrzewano do wrzenia przez 3h. Osad produktu odsączono i przemyto eterem dietylowym. Otrzymano 1.5g produktu (30%). ¹H NMR (D₂O): 1.21 (d, J=6.6Hz, 3H, CH₃), 3.75 (d, J=6.3Hz, 1H, CHCH₃), 3.77 (d, J=16.1Hz, 1H, CHP), 6.09, 6.23 (s + s, 1H + 1H, 2* β-furyl), 6.83 (d, J=527Hz, 1H, PH), 7.14-7.23 (m, 5H, C₆H₅), 7.30 (s, 1H, α-furyl); ³¹P NMR (D₂O): 24.4.

Kwas (1S,1'R)-N-benzylometylo-1-amino-(N'-tosylopirolo)metyleno-fosfinowy (146). Związek otrzymano analogicznie do związku **145** używając: 0.4g aldehydu N-tosylokarboksypirolowego i 0.27g soli kwasu podfosforawego i (R)-benzylometyloaminy. Otrzymano 0.20g produktu (28%). ¹H NMR (D₂O): 0.96 (d, J=6.4Hz, 3H, CHCH₃), 1.97 (s, 3H, C₆H₄CH₃), 3.45 (q, J=6.5Hz, 1H, CHCH₃), 4.26 (d, J=13.9Hz, 1H, CHP), 6.58 (d, J=527Hz, 1H, PH), 6.17 (s, 1H+1H, 2*β-pirol), 6.91 (d,

$J=8.1\text{Hz}$, 2H, 2* 3-tosyl), 6.96-7.02 (m, 5H, C_5H_5), 7.13 (s, 1H, α -pirol), 7.19 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H, 2-tosyl); ^{31}P NMR (D_2O): 25.7.

(2S)-2-Benzyloksykarbonyloamino-4-(hydroksymetylofosfino)maślan metylu (148). Do związku **130** (0.25g, ~2.5mmol) dodano 7ml HMDS. Całość ogrzewano do temperatury ok. 95°C przez 2h w atmosferze azotu. Następnie roztwór ochłodzono do 0°C i dodano związek **128** (0.37g, 1.0mmol). Mieszaninę ogrzewano do temperatury około 90°C przez 6h. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano 30ml metanolu i mieszano przez 1h. Następnie roztwór przesączono a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą HPLC (woda/acetonitryl). Otrzymano 60mg (17%) związku **148** oraz 15mg związku **154** i 10mg związku **161**. ^1H NMR (D_2O): 1.65 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 1.76, 1.95 (m+m, 1H+1H, CHCH_2), 3.57 (s, 3H, OCH_3), 3.61 (d, $J=5.2\text{Hz}$, CH_2OH), 4.10 (t, $J=5.3\text{Hz}$, 1H, CH), 4.96 (s, 2H, PhCH_2), 7.24-7.27 (m, 5H, C_6H_5); ^{31}P NMR (D_2O): 49.8. **Kwas P-benzylohydroksymetylofosfinowy (154).** ^1H NMR (D_2O): 3.05 (d, $J=16.6\text{Hz}$, 2H, PhCH_2), 3.55 (d, $J=5.2\text{Hz}$, 2H, CH_2OH), 7.14-7.24 (m, 5H, C_6H_5); ^{31}P NMR (D_2O): 46.2. **Laktam 2-aminomaślanu α -metylu (161).** ^1H NMR (D_2O): 2.14-2.22, 2.32-2.40 (m+m, 1H+1H, CHCH_2), 3.16 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.68 (s, 3H, OCH_3), 4.07 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 1H, CH).

(2S)-2-Benzyloksykarbonyloamino-4-[(1'-benzyloksykarbonyloaminoetylo) (hydroksy)fosfinylo]-maślan metylu (150). Związek otrzymano analogicznie do związku **148** używając: związek **128** (0.37g, 1.0mmol) i związek **139** (0.40g, 1.6mmol). Otrzymano 45mg (9%) związku **150** i 25mg związku **156**. Związek **150**: ^1H NMR (D_2O): 1.30 (dd, $J_{\text{PH}}=14.6\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=7.0\text{Hz}$, 3H, CHCH_3), 1.75 (m, 2H, CH_2P), 1.85, 2.15 (m+m, 1H+1H, CHCH_2), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 4.03, 4.32 (m+m, 1H+1H, 2* CH), 4.91-5.11 (m, 2H+2H, 2* PhCH_2), 5.62 (dd, $J_{\text{PH}}=19.9\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=9.1\text{Hz}$, 1H, PCHNH), 5.94 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H, CH_2CHNH), 7.24-7.32 (m, 5H+5H, 2* C_6H_5); ^{31}P NMR (D_2O): 56.04, 56.48 (dwa diastereoizomery). **Kwas P-benzylo-1-benzyloksykarbonyloaminoetylofosfinowy (156).** ^1H NMR (D_2O): 1.15 (dd, $J_{\text{PH}}=14.5\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=7.2\text{Hz}$, 3H, CHCH_3), 2.99 (d, $J=15.9\text{Hz}$, 2H, PhCH_2P), 3.96 (dt, $J=7.7\text{Hz}$, $J=5.5\text{Hz}$, 1H, CH), 5.07 (s, 2H, PhCH_2O), 5.11 (m, 1H, NH), 7.18-7.32 (m, 5H+5H, 2* C_6H_5); ^{31}P NMR (D_2O): 52.30 (90%) i 51.40 (10%) (dwa izomery o konfiguracji *trans* i *cis* wiązania amidowego grupy benzyloksykarbonyloaminowej) [212].

(2S)-2-Benzyloksykarbonyloamino-4-[(2'-benzyloksykarbonyloaminoetylo) (hydroksy)fosfinylo]-maślan metylu (151). Związek otrzymano analogicznie do

związku **148** używając: związek **128** (0.37g, 1.0mmol) i związek **144** (0.49g, 2.0mmol). Otrzymano 40mg (8%) związku **151** i 25mg związku **157**. Związek **151**: ^1H NMR (D_2O): 1.42 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 1.65, 1.84 (m+m, 1H+1H, CHCH_2), 1.65 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 3.16 (dt, $J_{\text{HH}}=8.3\text{Hz}$, $J_{\text{PH}}=7.3\text{Hz}$, 2H, CH_2N), 3.25 (s, 3H, OCH_3), 3.85 (m, 1H, CH), 5.00, 5.03 (s+s, 2H+2H, 2* PhCH_2O), 7.31 (m, 10H, 2* C_6H_5); ^{31}P NMR (D_2O): 43.0. **Kwas P-benzylo-2-benzyloksykarbonylo-aminoetylofosfinowy (157)**. ^1H NMR (D_2O): 1.49 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 2.75 (d, $J=17.2\text{Hz}$, PhCH_2P), 3.03 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 4.90 (s, 2H, PhCH_2O), 7.07-7.27 (m, 5H, C_6H_5); ^{31}P NMR (D_2O): 39.9.

(2S)-2-Benzyloksykarbonyloamino-4-[(2'-karbamoiloetylo)(hydroksy)fosfinylo]-maślan metylu (151). Związek otrzymano analogicznie do związku **148** używając: związek **128** (0.37g, 1.0mmol) i związek **141** (0.28g, 2.0mmol). Otrzymano 70mg (18%) produktu. ^1H NMR (D_2O): 1.63-1.96 (m, 2H+2H+2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{PCH}_2$), 2.45 (m, 2H, CH_2CONH_2), 3.60 (s, OCH_3), 4.15 (t, $J=5.4\text{Hz}$, CH), 4.98 (s, 2H, PhCH_2O), 7.28 (m, 5H, C_6H_5); ^{31}P NMR (D_2O): 57.15.

(2S)-2-amino-4-[(aminometylo)(hydroksy)fosfinylo]maślan metylu (163). Do związku **136** (0.0.46g, 2.0mmol) dodano 7ml HMDS. Całość ogrzewano do temperatury ok. 85°C przez 1h w atmosferze azotu. Następnie roztwór ochłodzono do 0°C i dodano związek **128** (0.37g, 1.0mmol). Mieszaninę ogrzewano do temperatury około 80°C przez 6h. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano 30ml metanolu i mieszano przez 1h. Następnie roztwór przesączono a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Przy pomocy HPLC (woda/acetonitryl) wydzielono mieszaninę związków **149** i **162**. Całość otrzymanej mieszaniny rozpuszczono w metanolu (10ml) i po dodaniu katalizatora palladowego (10%Pd/C, 30mg) hydrogenolizowano przez 2h. Następnie odsączono katalizator i rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną mieszaninę rozdzielono przy pomocy HPLC. Otrzymano 3.3mg (1.2%) związku **163**, 4mg związku **164**. Związek **163**. ^1H NMR (D_2O): 1.66 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 2.09 (m, 2H, CHCH_2), 2.97 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 2H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 4.12 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 1H, CH); ^{31}P NMR (D_2O): 32.02. **Kwas aminometylohydroksymetylofosfinowy (164)**. ^1H NMR (D_2O): 3.12 (d, $J=10.2\text{Hz}$, 2H, PCH_2NH_2), 3.33 (d, $J=9.4\text{Hz}$, 2H, PCH_2OH); ^{31}P NMR (D_2O): 20.07; ^{31}P NMR $\{^1\text{H}\}$ (D_2O): 20.7 (kwintet, $J=10\text{Hz}$).

Kwas (2S)-2-amino-4-[(hydroksymetylo)(hydroksy)fosfinylo]masłowy (112). Do związku **148** (60mg) dodano 30% roztwór HBr w kwasie octowym. Całość mieszano przez 12h. Następnie roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą

pozostałość rozpuszczono w stężonym kwasie solnym (10ml) i ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 8h. Następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 38mg (94%) produktu. ^1H NMR (D_2O): 1.84 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 2.11 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 3.75 (d, $J=5.0\text{Hz}$, 2H, CH_2OH), 4.07 (t, $J=5.0\text{Hz}$, 1H, CH); ^{31}P NMR (D_2O): 46.2; ^{13}C NMR (D_2O): 21.60 (d, $J_{\text{PC}}=89.5\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 22.20 (CHCH_2), 52.82 (d, $J_{\text{PC}}=15.4\text{Hz}$, CH), 58.05 (d, $J_{\text{PC}}=110.6\text{Hz}$, PCH_2OH), 170.96 (COOH).

Kwas (2S)-2-amino-4-[(1'-aminoetylo)(hydroksy)fosfinylo]masłowy (93). Związek otrzymano analogicznie do związku 112 używając 40mg związku 150. Otrzymano 21mg (88%) produktu. ^1H NMR (D_2O): 1.35 (dd, $J_{\text{PH}}=12.0\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=6.4\text{Hz}$, 3H, CHCH_3), 1.72 (m, 2H, CH_2P), 2.14 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 3.31 (m, 1H, CHCH_3), 4.04 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 1H, CHCH_2); ^{31}P NMR (D_2O): 36.01; ^{13}C NMR (D_2O): 12.80 (CH_3), 22.76 (CHCH_2), 23.15 (d, $J_{\text{PC}}=93.8\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 45.77 (d, $J_{\text{PC}}=94.9\text{Hz}$, CHP), 53.60 (CHCOOH), 172.02 (COOH).

Kwas (2S)-2-amino-4-[(2'-aminoetylo)(hydroksy)fosfinylo]masłowy (114). Związek otrzymano analogicznie do związku 112 używając 40mg związku 151. Otrzymano 15mg (65%) produktu. ^1H NMR (D_2O): 1.78 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 2.06 (m, 2H+2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 3.17 (dt, $J_{\text{PH}}=7.2\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=8.4\text{Hz}$, 2H, CH_2NH_2), 4.10 (t, $J=5.7\text{Hz}$, 1H, CH); ^{31}P NMR (D_2O): 47.3; ^{13}C NMR (D_2O): 22.45 (CHCH_2), 24.60 (d, $J_{\text{PC}}=93.0\text{Hz}$, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 25.67 (d, $J_{\text{PC}}=90.4\text{Hz}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 33.87 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 52.88 (d, $J_{\text{PC}}=16.0\text{Hz}$, CHCH_2), 171.06 (COOH).

Kwas (2S)-2-amino-4-[(2'-karboksyetylo)(hydroksy)fosfinylo]masłowy (165). Związek 153 (70mg) rozpuszczono w 10ml dichlorometanu i dodano trimetylobromosilan (2ml). Całość mieszano przez 5dni. Następnie roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano 10ml wody i mieszano przez 12h. Następnie roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano 10ml stężonego kwasu solnego i mieszano przez 1h. Roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 47mg produktu (95%). ^1H NMR (D_2O): 1.84 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 2.03 (dt, $J_{\text{PH}}=13.2\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=8.0\text{Hz}$, 2H, $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.12 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 2.54 (dt, $J_{\text{PH}}=12.6\text{Hz}$, $J_{\text{HH}}=7.5\text{Hz}$, 2H, $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 4.09 (t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H, CH); ^{31}P NMR (D_2O): 54.8; ^{13}C NMR (D_2O): 22.36 (CHCH_2), 23.13, 23.83 (d+d, $J_{\text{PC}}=93.2\text{Hz}$, $J_{\text{PC}}=91.6\text{Hz}$, CH_2PCH_2), 26.25 (CH_2COOH), 52.80 (d, $J_{\text{PC}}=16.4\text{Hz}$, CH), 170.96 (CHCOOH), 176.32 (d, $J=14.1\text{Hz}$, CH_2COOH); ESI-MS (m/z): 240 ($\text{M}+1$).

Kwas (2S)-2-amino-4-[(aminometylo)(hydroksy)fosfinylo]masłowy (92). Związek **163** (3.3mg, 0.012mmol) rozpuszczono w 10ml stężonego kwasu solnego i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 8h. Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 3.0mg produktu (95%). ^1H NMR (D_2O): 1.73 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 2.07 (m, 2H, CHCH_2), 2.98 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 2H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 4.00 (t, $J=6.1\text{Hz}$, 1H, CH); ^{31}P NMR (D_2O): 33.53; ^{13}C NMR (D_2O): 22.90 (CHCH_2), 25.06 (d, $J_{\text{PC}}=96.0\text{Hz}$, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 37.37 (d, $J_{\text{PC}}=91.8\text{Hz}$, PCH_2NH_2), 53.47 (d, $J_{\text{PC}}=15.1\text{Hz}$, CH), 171.85 (COOH).

5.2.3.2. Utlenianie kwasów H-fosfinowych

Reakcja utleniania kwasów fosfinowych była kontrolowana przy pomocy ^{31}P NMR a produkty nie były dodatkowo oczyszczane. Ogólny protokół postępowania: Do 0.5mmol kwasu fosfinowego dodano 3ml heksametylodisilazanu. Mieszaninę ogrzewano do temperatury ok. 85°C silnie mieszając aż do zaniku kwasu H-fosfinowego. Następnie dodano 20ml metanolu i mieszano przez 1h. Po tym czasie roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Jako substratów w tej reakcji użyto kwasów H-fosfinowych: **130, 135, 136, 139, 144, 141, 166, 167, 168, 169, 170**. Związki **166-170** były otrzymane metodą Baylisa [188]. Widma ^{31}P i ^1H NMR dla związków **171-177, 179 i 180** były zgodne z tymi opisanymi w literaturze [213-219], natomiast te dla związków **178 i 181** przedstawiono poniżej.

Kwas N-benzylloksykarbonylo-1-amino-3-fenylpropanofosfonowy (178). ^1H NMR (D_2O): 1.68, 2.05 (m+m, 1H+1H, PhCH_2CH_2), 2.53 (m, 2H, PhCH_2CH_2), 3.41 (m, 2H, CH), 5.01 (AB, $J=12\text{Hz}$, 2H, PhCH_2O), 7.14-7.36 (m, 5H+5H, 2* C_6H_5); ^{31}P NMR (D_2O): 18.27.

Kwas N-fluorenometyloksykarbonylo-1-amino-3-metylobutylofosfonowy (181). ^1H NMR (D_2O): 0.67, 0.87 (d+d, $J=13.5\text{Hz}$, $J=11.5\text{Hz}$, 3H+3H, 2* CH_3), 1.21 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.60 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.53, 3.95 (m+m., 1H+1H, CH_2O), 4.20 ($\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.53 (m, 1H, CH (fluoren)), 7.12-7.70 (m, 8H, fluoren); ^{31}P NMR (D_2O): 21.89.

5.2.3.3. Synteza analogów kwasu 4-N-hydroksy-2,4-diaminomasłowego

Chlorowodorek asparaginianu β -metylu (208). Metanol (100ml) ochłodzono do -10°C i dodano kroplami 15.5ml SOCl_2 . Następnie utrzymując temperaturę 0°C dodano 20g (150mmol) kwasu L-asparaginowego. Całość mieszano przez 25min. doprowadzając powoli do temperatury pokojowej. Następnie dodano 400 ml eteru dietylowego i odsączono powstały osad. Osad przemyto niewielką ilością eteru i wysuszono na powietrzu. Otrzymano 22.3g (81%) estru. ^1H NMR (D_2O): 2.97 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 2H, CH_2), 3.59 (s, 3H, OCH_3), 4.22 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H, CH).

N-Benzylloksykarbonyloasparaginian β -metylu (209). Związek 208 (18.0g, 98mmol) rozpuszczono w 140ml wody, dodano tlenku magnezu (11.85g), eteru dietylowego (44ml), chloromrówcznu benzylu (30ml, 210mmol) i całość mieszano w temperaturze $0-5^{\circ}\text{C}$ przez 6 godzin. Następnie mieszaninę przesączono. Osad na sączku przemyto wodą. Otrzymany przesącz przemyto eterem dietylowym (trzy razy 50ml). Warstwę wodną zakwaszono stężonym kwasem solnym do $\text{pH}=3$ i wytrącony produkt ekstrahowano benzenem. Rozpuszczalnik usunięto na wyparce obrotowej. Następnie trzy razy olej rozpuszczano w benzenie i odparowywano w celu usunięcia wody. Olej rozpuszczono w niewielkiej ilości benzenu i dodano pentanu do zmętnienia i pozostawiono na noc. Następnego dnia odsączono osad i wysuszono na powietrzu. Otrzymano 22.0g produktu (80%). ^1H NMR (CDCl_3): 2.94 (ABX, $J_{\text{AB}}=17.2\text{Hz}$, $J_{\text{AX}}=4.5\text{Hz}$, 2H, CHCH_2), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 4.65 (dt, $J=9.0\text{Hz}$, $J=4.2\text{Hz}$, 1H, CH), 5.09 (s, 2H, PhCH_2O), 5.84 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, NH), 6.07 (bs, 1H, COOH), 7.29-7.33 (m, 5H, C_6H_5).

Mieszany ester β -metylowy i α -tert-butylowy kwasu N-benzylloksykarbonyloasparaginowego (210). Związek 209 (22.0g, 78mmol) rozpuszczono w dichlorometanie (100ml), oziębiono do -5°C i dodano 1ml stężonego kwasu siarkowego. Przez roztwór przepuszczono gazowy izobutylen do momentu, kiedy masa całości wzrosła o 11g (196mmol izobutyleny). Roztwór pozostawiono na dwie doby w temperaturze pokojowej. Następnie usunięto nadmiar izobutyleny i część rozpuszczalnika przy pomocy wyparki obrotowej. Roztwór przemyto kolejno: wodą (dwa razy), 5% wodnym roztworem NaHCO_3 (dwa razy), wodą (raz) i wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 . Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik odparowano otrzymując 16.5g produktu (63%). ^1H NMR (CDCl_3): 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.88

(ABX, $J_{AB}=16.8\text{Hz}$, $J_{AX}=4.8\text{Hz}$, 2H, CHCH_2), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 4.49 (dt, $J=8.4\text{Hz}$, $J=4.5\text{Hz}$, 1H, CH), 5.09 (s, 2H, PhCH_2), 5.68 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H, NH), 7.28-7.34 (m, 5H, C_6H_5).

***N*-Benzyloksykarbonyloasparaginian α -*tert*-butylu (211).** W 100ml metanolu rozpuszczono związek **210** (16.5g, 49mmol). Następnie dodano NaOH (1.96g, 49mmol) rozpuszczonego w 25ml wody. Całość mieszano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie metanol usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostały roztwór wodny przemyto eterem (dwa razy 30ml) i warstwy eterowe odrzucono. Warstwę wodną zakwaszono przy pomocy 10% roztworu kwasu solnego do pH=2 i ekstrahowano octanem etylu (dwa razy 50ml). Połączone warstwy organiczne przemyto wodą i wysuszono na bezwodnym MgSO_4 . Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik usunięto przy pomocy wyparki obrotowej. Otrzymano 15.0g (95%). ^1H NMR (CDCl_3): 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.91 (ABX, $J_{AB}=17.3\text{Hz}$, $J_{AX}=4.7\text{Hz}$, 2H, CHCH_2), 4.49 (dt, $J=8.2\text{Hz}$, $J=4.5\text{Hz}$, 1H, CH), 5.08 (s, 2H, PhCH_2), 5.74 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H, NH), 6.70 (bs, 1H, COOH), 7.33 (m, 5H, C_6H_5).

Ester *tert*-butylowy (2S)-*N*-benzyloksykarbonylohomoseryny (212). Roztwór związku **211** (6.55g, 20mmol) w suchym THF ochłodzono do temperatury -10°C i dodano *N*-metylomarfolinę (2.03g, 20mmol). Następnie wkroplono chloromrówczan etylu (2.17g, 20mmol) i całość mieszano przez 15min. Odsączono chlorowoderek *N*-metylomorfoliny a przesącz dodano do zawiesiny NaBH_4 (1.67g, 45mmol) w wodzie (10ml) o temperaturze $5-10^\circ\text{C}$. Następnie całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 4h. Po tym czasie zawiesinę ochłodzono do ok. 5°C i zakwaszono 3M kwasem solnym do pH=2. Produkt ekstrahowano octanem etylu (trzy razy 50ml). Połączone frakcje organiczne przemyto wodą (dwa razy 50ml) i wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 . Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, octan etylu/heksan). Otrzymano 3.3g produktu (56%). ^1H NMR (CDCl_3): 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.18 (m, 2H, CHCH_2), 2.92 (bs, 1H, OH), 3.61-3.69 (m, 2H, CH_2OH), 4.40 (m, 2H, CH), 5.09 (AB, $J_{AB}=12.2\text{Hz}$, 2H, PhCH_2), 5.59 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 1H, NH), 7.32 (m, 5H, C_6H_5).

Ester *tert*-butylowy (2S)-*N*-benzyloksykarbonylohomoserynalu (213). Roztwór chlorku oksalilu (0.72ml, 8.25mmol) w 20ml suchego CH_2Cl_2 w atmosferze azotu ochłodzono do temperatury ok. -65°C . Następnie wkroplono DMSO (1.17ml,

16.5mmol) i dodano **212** (2.2g, 7.5mmol). Całość mieszano przez ok. 1h. Następnie dodano trietyloaminę (5.22ml, 37.5mmol) i mieszano jeszcze przez 5min. Mieszaninę ogrzano powoli do temperatury pokojowej i rozcieńczono 100ml dichlorometanu. Roztwór przemyto solanką (raz 70ml) i wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 . Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt użyto do dalszych reakcji. ^1H NMR (CDCl_3): 1.38 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.86 (ABX, $J_{\text{AB}}=17.1\text{Hz}$, $J_{\text{AX}}=4.4\text{Hz}$, 2H, CHCH_2), 4.45 (m, 1H, CH), 5.04 (m, 2H, PhCH_2), 5.66 (d, $J=7.8\text{Hz}$, NH), 7.27 (m, 5H, C_6H_5), 9.95 (s, 1H, CHO).

***N*-Benzylooksym estru *tert*-butylowego (2S)-*N*-benzyloksykarbonylohomoserynalu (214).** Całość związku **213** z poprzedniej reakcji rozpuszczono w 10ml etanolu i dodano chlorowodorku *O*-benzylohydroksylaminy (1.2g, 7.5mmol) oraz 10ml pirydyny. Roztwór mieszano przez noc i następnie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Powstały olej oczyszczono przy użyciu kolumny chromatograficznej (żel krzemionkowy, octan etylu/heksan 1/4). Otrzymano 2.2g produktu (71% z alkoholu **212**). ^1H NMR (CDCl_3): 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.59-2.83 (m, 2H, CHCH_2), 4.41 (m, 1H, CHNH), 5.00, 5.07 (s+s, 2H+2H, 2* PhCH_2), 5.43 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H, NH), 7.23-7.38 (m, 5H+5H+1H, 2* C_6H_5 + CHNO).

Ester *tert*-butylowy kwasu (2S)-2-*N*-benzyloksykarbonylo-4*N'*-benzyloksy-2,4-diaminomazowego (215). Związek **214** (0.85g, 2.1mmol) rozpuszczono w 20ml metanolu i dodano bezwodnego kwasu szczawiowego do pH=3. Następnie dodano $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ (0.20g, 3.1mmol) i mieszano przez 2h utrzymując stałe pH=3 przez dodawanie kolejnych porcji bezwodnego kwasu szczawiowego. Po tym czasie roztwór zobojętniono dodając 1M roztwór NaOH i następnie odparowano metanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostały roztwór wodny ekstrahowano octanem etylu (trzy razy 40ml). Połączone fazy organiczne przemyto wodą (30ml), solanką (30ml) i wysuszono nad bezwodnym Na_2SO_4 . Po odsączeniu środka suszącego odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 0.65g produktu (77%). $[\alpha]_{\text{D}}=-12.5^\circ$ ($c=3.3$, octan etylu); t.t.=62-64°C; ^1H NMR (CDCl_3): 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.77-1.86, 2.02-2.09 (m oraz m, 1H+1H, CHCH_2), 2.99 (m, 2H, CH_2N), 4.30 (m, 1H, CH), 4.67 (s, 2H, PhCH_2ONH), 5.08 (s, 2H, PhCH_2OCO), 5.60 (bs, 1H, NHOBzl), 5.67 (d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H, NHCO), 7.24-7.33 (m, 10H, 2* C_6H_5). ^{13}C NMR (CDCl_3): 27.90 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.04 (CHCH_2), 48.23 (CH_2N), 53.05 (CH), 66.93 (PhCH_2OCO), 76.33 (PhCH_2ON), 82.14 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.93, 128.14, 128.44, 128.50, 128.53, 128.95, 136.44, 137.68 (2* C_6H_5), 156.11 (PhCH_2OCO), 171.40 (COt-Bu).

Ester *tert*-butylowy kwasu (2S)-2-*N*-benzyloksykarbonylo-4-*N'*-benzyloksy-4-*N'*-karbamoilo-2,4-diaminomasłowego (216). W 10ml suchego dioksanu rozpuszczono **215** (0.30g, 0.72mmol). Do roztworu dodano izocyjanian trimetylosililowy (0.13g, 0.15ml, 1.1mmol). Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 3h. Następnie do roztworu dodano nasycony roztwór chlorku amonu (10ml) i mieszano przez 1h. Mieszaninę ekstrahowano octanem etylu (trzy razy 20ml) i połączone frakcje organiczne wysuszono nad siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 0.31g produktu (95%). ¹H NMR (CDCl₃): 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.92, 2.10 (m oraz m, 1H+1H, CHCH₂), 3.55 (m, 2H, CH₂N), 4.22 (m, 1H, CH), 4.75 (s, 2H, PhCH₂ON), 5.07 (s, 2H, PhCH₂OCO), 5.72-5.77 (m, 1H+2H, NH+NH₂), 7.25-7.34 (m, 10H, 2* C₆H₅). ¹³C NMR: 27.85 (CH₃), 29.23 (CHCH₂), 44.89 (CH₂N), 52.58 (CH), 66.81 (PhCH₂OCO), 76.73 (PhCH₂ON), 82.27 (C(CH₃)₃), 128.00, 128.43, 128.67, 129.02, 129.23, 129.34, 134.64, 136.36 (2* C₆H₅), 156.06 (PhCH₂OCO), 161.31 (CONH₂), 170.99 (CO*t*-Bu).

Ester *tert*-butylowy kwasu (2S)-2-*N*-benzyloksykarbonylo-4-*N'*-benzyloksy-4-*N'*-acetylo-2,4-diaminomasłowego (217). Związek **215** (0.33g, 0.8mmol) rozpuszczono w 10ml chloroformu i dodano kroplami bezwodnik octowy (0.3g, 3mmol). Roztwór mieszano w temperaturze pokojowej przez 3h. Następnie mieszanina reakcyjna została przemyta wodą (10ml) i solanką (10ml) i wysuszona nad bezwodnym Na₂SO₄. Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, octan etylu/heksan). Otrzymano 0.30g produktu (83%). ¹H NMR (CDCl₃): 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.02 (s, 3H, OCCH₃), 2.02, 2.12 (m oraz m, 1H+1H, CHCH₂), 3.67 (m, 2H, CH₂N), 4.25 (m, 1H, CH), 4.75 (s, 2H, PhCH₂ON), 5.06 (s, 2H, PhCH₂OCO), 5.75 (d, J=6.9Hz, NH), 7.32 (m, 10H, 2* C₆H₅). ¹³C NMR (CDCl₃): 20.10 (CH₃CO), 28.82 (C(CH₃)₃), 29.33 (CHCH₂), 42.00 (CH₂N), 52.46 (CH), 66.84 (PhCH₂OCO), 76.39 (PhCH₂ON), 82.33 (C(CH₃)₃), 127.98, 128.42, 128.71, 129.06, 129.23, 129.38, 134.07, 136.33 (2* C₆H₅), 156.12 (PhCH₂OCO), 170.79 (COO*t*-Bu), 173.11 (CH₃CO).

***N*-Benzyloksykarbonylo-3-bromoetyloamina (218).** Bromowodorek 2-bromoetyloaminy (2.05g, 10mmol) został rozpuszczony w mieszaninie 5ml wody i 5ml dioksanu. Do roztworu dodano roztwór chloromrówczanu benzylu (2.1g, 12 mmol) w 5ml dioksanu i następnie tyle 3M roztworu K₂CO₃ aby osiągnąć pH=6-7. Roztwór mieszano przez 3h utrzymując zasadowy odczyn. Mieszaninę poreakcyjną

ekstrahowano eterem dietylowym (trzy razy 30ml) i połączone warstwy eterowe przemyto 1M roztworem NaOH i wodą (dwa razy). Roztwór wysuszono nad bezwodnym Na₂SO₄. Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, octan etylu/heksan, 1/10). Otrzymano 1.8g produktu (70%). ¹H NMR (CDCl₃): 3.44 (t, J=6.8Hz, 2H, CH₂Br), 3.57 (q, J=7Hz, 2H, CH₂NH), 5.08 (s, 2H, PhCH₂), 5.26 (bs, 1H, NH), 7.28-7.36 (m, 5H, C₆H₅).

N-Benzyloksykarbonylo-3-bromopropylaamina (219). Syntezę przeprowadzono analogicznie do syntezy związku **218** używając: 2.2g (10mmol) bromowodorku 3-bromopropylaaminy i 2.1g (12mmol) chloromrówczanu benzylu. Otrzymano 1.95g produktu (72%). ¹H NMR (CDCl₃): 2.06 (qt, J=6.4Hz, 2H, CH₂CH₂Br), 3.33 (q, J=6.4Hz, 2H, CH₂NH), 3.41 (t, J=6.4Hz, 2H, CH₂Br), 4.86 (bs, 1H, NH), 5.08 (s, 2H, PhCH₂), 7.26-7.37 (m, 5H, C₆H₅).

Ester *tert*-butylowy kwasu (2S)-2-*N*-benzyloksykarbonylo-4-*N'*-benzyloksy-4-*N'*-(2-*N''*-benzyloksykarbonylo)aminoetylo-2,4-diaminomasłowego (220). W 10ml acetonu rozpuszczono: związek **215** (0.24g, 0.58mmol), związek **218** (0.15g, 0.58mmol), 18-koronę-6 (0.05g) i następnie dodano 1g bezwodnego węglanu potasu. Całość ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 50h. Następnie odsączono węgiel potasu i usunięto rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą HPLC (woda, acetonitryl). Otrzymano 0.16 g (47%) produktu. ¹H NMR (CDCl₃): 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.75, 2.15 (m+m, 1H+1H, CHCH₂), 2.68, 2.88 (m+m, 1H+1H, CH₂CH₂NHCO), 2.78 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 3.14, 3.31 (m+m, 1H+1H, CH₂CH₂NHCO), 4.50 (m, 1H, CH), 4.66 (s, 2H, PhCH₂ON), 5.04-5.59 (m, 2H+2H, 2* PhCH₂OCO), 5.60 (d, J=8.2Hz, NHCH), 5.50 (bs, CH₂NH), 7.24-7.36 (m, 15H, 3* C₆H₅). ¹³C NMR (CDCl₃): 28.06 (C(CH₃)₃), 30.24 (CHCH₂), 38.67 (CH₂NH), 52.77 (CH), 54.69, 58.05 (2* CH₂N), 66.54, 67.01 (2* PhCH₂OCO), 75.89 (PhCH₂ON), 82.34 (C(CH₃)₃), 128.03, 128.19, 128.24, 128.32, 128.50, 128.54, 128.72, 128.89, 129.46, 130.96, 136.38, 136.83 (3* C₆H₅), 156.11, 156.51 (2* PhCH₂OCO), 171.68 (COOt-Bu).

Ester *tert*-butylowy kwasu (2S)-2-*N*-benzyloksykarbonylo-4-*N'*-benzyloksy-4-*N'*-(3-*N''*-benzyloksykarbonylo)aminopropyla-2,4-diaminomasłowego (221). Związek ten otrzymano analogicznie do związku **220** używając: *N*-benzyloksykarbonylo-3-bromopropylaaminę (**219**) (0.2g, 0.73mmol). Otrzymano 0.17 g (49%) produktu. ¹H NMR (CDCl₃): 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.70 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 1.77, 2.11 (m+m,

$1\text{H}+1\text{H}$, CHCH_2), 2.67 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.84 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.22 (m, 2H, CH_2NH), 4.47 (m, 1H, CH), 4.71 (s, 2H, PhCH_2ON), 5.05, 5.07 (s+s, 2H+2H, 2* PhCH_2OCO), 5.33 (bs, 1H, CH_2NH), 5.67 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H, CHNH), 7.26-7.30 (m, 15H, 3* C_6H_5); ^{13}C NMR (CDCl_3): 27.07 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 28.05 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.46 (CHCH_2), 39.00 (CH_2NH), 52.90 (CH), 55.12, 56.21 (2* CH_2N), 66.52, 66.87 (2* PhCH_2OCO), 76.09 (PhCH_2ON), 82.23 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.93, 127.99, 128.04, 128.12, 128.17, 128.48, 128.51, 128.53, 128.83, 130.96, 136.36, 137.14 (3* C_6H_5), 156.08, 156.54 (2* PhCH_2OCO), 171.66 ($\text{COO}t\text{-Bu}$).

Ester *tert*-butylowy kwasu (2S)-2-*N*-benzyloksykarbonylo-4-*N'*-benzyloksy-4-*N'*-(*N''*-benzyloksykarbonylo)glicylo-2,4-diaminomasłowego (225). *N*-

Benzyloksykarbonylo-glicynę (0.3g, 1.5mmol) i trietyloaminę (0.15g, 1.8mmol) rozpuszczono w suchym THF (20ml). Roztwór oziębiono do temperatury -15°C i dodano chloromrówczan izobutyłu (0.19g, 1.5mmol). Całość mieszano przez 0.5h i następnie dodano związek **215** (0.4g, 1.0mmol). Roztwór mieszano w temperaturze -15°C jeszcze przez 3h a potem pozostawiono do powolnego ocieplenia do temperatury pokojowej. Wytrącony osad chlorowodoru trietyloaminy odsączono. Z przesączu usunięto rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostały olej rozpuszczono w octanie etylu (30ml) i przemyto kolejno: 5% roztworem NaHCO_3 (20ml), 5% roztworem kwasu cytrynowego (20ml) i solanką. Roztwór wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu i po odsączeniu środka suszącego odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany olej oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, octan etylu / heksan). Otrzymano 0.3g produktu (50%). ^1H NMR (CDCl_3): 1.40 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.96, 2.12 (m+m, 1H+1H, CHCH_2), 3.68 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.05 (d, $J=3.8\text{Hz}$, 2H, NHCH_2CO), 4.25 (m, 1H, CH), 4.80 (s, 2H, PhCH_2ON), 5.08, 5.09 (s+s, 2H+2H, 2* PhCH_2OCO), 5.42 (m+m, 1H+1H, 2* NH), 7.25-7.30 (m, 15H, 3* C_6H_5).

Ester *tert*-butylowy kwasu (2*S*,1'*S*)2-*N*-benzyloksykarbonylo-4-*N'*-benzyloksy-4-*N'*-(*N''*-benzyloksykarbonylo)glicylo-2,4-diaminomasłowego (226). Związek ten otrzymano analogicznie do związku **225** używając *N*-benzyloksykarbonyloalaniny (0.33g, 1.5mmol). Otrzymano 0.3g produktu (48%). ¹H NMR (CDCl₃): 1.27 (d, J=6.4Hz, 3H, CHCH₃), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.85, 2.19 (m+m, 1H+1H, CHCH₂), 3.37, 3.92 (m+m, 1H+1H, CH₂N), 4.26 (m, 1H, CHCH₂), 4.77 (m, CHCH₃), 4.89 (s, 2H, PhCH₂ON), 5.08, 5.09 (s+s, 2H+2H, 2* PhCH₂OCO), 5.39, 5.51 (d+d, J=7.3Hz, J=8.3Hz, 2* NH), 7.23-7.35 (m, 15H, 3* C₆H₅).

Ester *tert*-butylowy kwasu (2*S*,1'*S*)-2-*N*-benzyloksykarbonylo-4-*N'*-benzyloksy-4-*N'*-(*O*-benzylo-*N''*-benzyloksykarbonylo)serylo-2,4-diaminomasłowego (227). Związek otrzymano analogicznie do związku **225** używając *O*-benzylo-*N*-benzyloksykarbonylo-L-seryny (0.5g, 1.5mmol). Otrzymano 0.27g produktu (38%). ¹H NMR (CDCl₃): 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.89, 2.18 (m+m, 1H+1H, CHCH₂CH₂), 3.49, 3.93 (m+m, 1H+1H, CH₂N), 3.64 (m, 2H, CHCH₂O), 3.93 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 4.30 (AB, J=12.1Hz, 2H, PhCH₂OCH₂), 4.89 (s, 2H, PhCH₂ON), 5.10, 5.12 (s+s, 2H+2H, 2* PhCH₂OCO), 5.53, 5.85 (d+d, J=Hz, J=8.5Hz, 2* NH), 7.19-7.36 (m, 20H, 4* C₆H₅).

Ester *tert*-butylowy kwasu (2*S*)-2-*N*-benzyloksykarbonylo-4-*N'*-benzyloksy-4-*N'*-(3-benzyloksykarbonyloaminopropionylo)-2,4-diaminomasłowego (229). Związek ten otrzymano analogicznie do związku **225** używając *N*-benzyloksykarbonylo-β-alaninę (**228**) (0.33g, 1.5mmol). Otrzymano 0.29g produktu (47%). ¹H NMR (CDCl₃): 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.96, 2.13 (m+m, 1H+1H, CHCH₂), 2.57 (m, 2H, CH₂CO), 3.42 (m, 2H, CH₂NHCO), 3.72 (m, 2H, CH₂NO), 4.28 (m, 1H, CH), 4.72 (s, 2H, PhCH₂ON), 5.06 (s, 4H, 2* PhCH₂OCO), 5.81 (m, 2H, 2* NH), 7.29-7.34 (m, 15H, 3* C₆H₅). ¹³C NMR (CDCl₃): 27.84 (CH₃), 29.26 (CHCH₂), 32.50 (CH₂CON), 36.32 (CH₂NHCO), 41.60 (CH₂NO), 52.27 (CH), 66.66, 66.99 (2* PhCH₂OCO), 76.35 (PhCH₂ON), 82.46 (C(CH₃)₃), 127.97, 128.07, 128.45, 128.74, 129.14, 129.28, 133.89, 136.24, 136.49 (3* C₆H₅), 156.25, 156.74 (2* PhCH₂OCO), 170.90 (COOt-Bu), 172.50 (CON).

Kwas (2*S*)-4-*N*-hydroksy-2,4-diaminomasłowy (65). Związek **215** (0.3g, 0.72mmol) rozpuszczono w mieszaninie chlorku metylenu (3ml) i kwasu trifluorooctowego (3.5ml). Roztwór mieszało przez 12h i następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 5ml metanolu, następnie dodano 3ml 1M kwasu solnego i 30mg katalizatora palladowego (10%Pd/C). Przez mieszaninę przepuszczano wodór pod ciśnieniem atmosferycznym przez 2h. Po tym czasie katalizator odsączono a rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

Pozostały osad oczyszczono za pomocą HPLC (1% roztwór TFA w wodzie). Otrzymano 76mg produktu (63%). ^1H MNR (D_2O): 2.14-2.36 (m, 2H, CHCH_2), 3.39-3.47 (m, 2H, CH_2N), 4.06 (t, $J=6\text{Hz}$ 1H, CH); ^{13}C NMR (D_2O): 24.04 (CHCH_2), 46.97 (CH_2N), 50.55 (CH), 170.80 (COOH), ESI-MS (m/z): 135 (M+1).

Kwas (2S)-4-N-hydroksy-4-N-karbamoilo-2,4-diaminomasłowy (201). Związek otrzymano analogicznie do związku **65** używając związku **216** (0.3g, 0.66mmol). Otrzymano 79mg produktu (56%). ^1H MNR (D_2O): 2.03-2.15, 2.17-2.28 (m+m, 1H+1H, CHCH_2), 3.60 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 2H, CH_2N), 4.02 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 1H, CH); ^{13}C NMR (D_2O): 27.22 (CHCH_2), 45.42 (CH_2N), 50.38 (CH), 162.66 (CONH_2), 171.37 (COOH); ESI-MS (m/z): 178 (M+1).

Kwasu (2S)-4-N-hydroksy-4-N-glicylo-2,4-diaminomasłowy (193). Związek **225** (0.3g, 0.5mmol) rozpuszczono w 30% roztworze HBr w kwasie octowym. Roztwór mieszano przez 12h a następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany olej rozpuszczono w 5ml metanolu. Do roztworu dodano 3ml 1M kwasu solnego i 30mg katalizatora palladowego (10%Pd/C). Przez mieszaninę przepuszczano wodór pod ciśnieniem atmosferycznym przez 2h. Po odsączeniu katalizatora roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy pomocy chromatografii HPLC (1% roztwór TFA w wodzie). Otrzymano 72mg produktu (55%). ^1H MNR (D_2O): 2.12-2.30 (m, 2H, CHCH_2), 3.77 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.99 (m, 1H+2H, CH + CH_2NH_2); ^{13}C NMR (D_2O): 26.95 (CHCH_2), 39.73 (CH_2NH_2), 44.70 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 50.86 (CH), 167.38 (CON), 171.78 (COOH). ESI-MS (m/z): 192 (M+1), 174 (M+1-18 (H_2O)).

Kwas (2S)-4-N-hydroksy-4-N-alanylo-2,4-diaminomasłowy (194). Ten dipeptyd otrzymano analogicznie do związku **193** używając związku **226** (0.3g, 0.48mmol). Otrzymano 66mg produktu (49%). ^1H MNR (D_2O): 1.42 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H, CH_3), 2.13-2.32 (m, 2H, CHCH_2), 3.79 (m, 2H, CH_2N), 4.03 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 1H, CHCH_2), 4.47 (q, $J=6.9\text{Hz}$, 1H, CHCH_3); ^{13}C NMR (D_2O): 15.10 (CH_3), 26.82 (CHCH_2), 44.91 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 47.41 (CHCH_3), 50.52 (CHCH_2), 170.52, 171.26 (COOH, CON); ESI-MS (m/z): 206 (M+1).

Kwas 4-N-hydroksy-4-N-serylo-2,4-diaminomasłowy (195). Związek ten otrzymano analogicznie do związku **193** używając związku **227** (0.27g, 0.38mmol). Otrzymano 30mg produktu (27%). ^1H MNR (D_2O): 2.12-2.21, 2.23-2.32 (m+m, 1H+1H, CHCH_2CH_2), 3.79 (m, 2H, CH_2N), 3.90 (m, 2H, CHCH_2OH), 4.03 (t, $J=6.2\text{Hz}$, 1H, CHCH_2CH_2), 4.55 (t, $J=3.8\text{Hz}$, 1H, CHCH_2OH); ^{13}C NMR (D_2O): 26.86 (CHCH_2CH_2),

45.06 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 50.60 (CHCH_2CH_2), 53.33 (CH_2OH), 58.78 (CHCH_2OH), 167.41 (CON), 171.42 (COOH); ESI-MS (m/z): 222 ($\text{M}+1$).

Kwas 4-*N*-hydroksy-4-*N*-(2-aminoetylo)-2,4-diaminomasłowego (186). Związek otrzymano analogicznie do związku **65** używając związku **220** (0.16g, 0.27mmol). Otrzymano 37mg produktu (55%). ^1H MNR (D_2O): 2.17 (m, 2H, CHCH_2), 3.18-3.36 (m, 6H, 3* CH_2N), 3.85 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 1H, CH); ^{13}C NMR (D_2O): 26.61 (CHCH_2), 35.53 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 44.09, 45.09 (2* CH_2NO), 52.05 (CH), 172.48 (COOH).

Kwas 4-*N*-hydroksy-4-*N*-(3-aminopropylo)-2,4-diaminomasłowego (187). Związek otrzymano analogicznie do związku **65** używając związku **221** (0.16g, 0.26mmol). Otrzymano 36mg produktu (52%). ^1H MNR (D_2O): 1.95 (qt, $J=7\text{Hz}$, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 2.12-2.30 (m, 2H, CHCH_2), 2.97, 3.07 (t+t, $J=7.3\text{Hz}$, $J=8\text{Hz}$, 2H+2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.17-2.26 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.17 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 1H, CH); ^{13}C NMR (D_2O): 23.80 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 26.42 (CHCH_2), 36.67 (CH_2NH_2), 44.17, 44.83 (2* CH_2NO), 50.40 (CH), 170.51 (COOH).

7. Literatura

1. D.L. Purich, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **1998**, 72, 9-42.
2. A. Ginsburg, *Adv. Protein Chem.* **1972**, 26, 1-76.
3. P.B. Chock, E.R. Stadtman, *Methods Enzymol.* **1980**, 64, 297-325.
4. E.R. Stadtman, A. Ginsburg, w: P.D. Boyer (Ed.) *The Enzymes*, vol. 10, Academic Press, New York **1974**, strony 755-807.
5. A. Meister, w: R. Palacios, J. Mora (Eds) *Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation of Glutamine Metabolism*, Academic Press, New York **1980**, strony 1-40.
6. H. A. Krebs, *Biochem. J.* **1935**, 29, 1951-1954.
7. J.F. Speck, *J. Biol. Chem.* **1949**, 179, 1405-1411.
8. W.H. Elliot, *Biochem. J.* **1951**, 49, 106-112.
9. Y. Kumada, D.R. Benson, D. Hillemann, T.J. Hosted, D.A. Rochefort, C.J. Thompson, W. Wohlleben, Y. Tateno, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 3009-3013.
10. J.J. Doyle, *Mol. Biol. Evol.* **1991**, 8, 366-377.
11. G. Pesole, C. Gissi, C. Lanave, C. Saccone, *Mol. Biol. Evol.* **1995**, 12, 189-197.
12. R.G. Shatters, M.L. Kahn, *J. Mol. Evol.* **1989**, 29, 422-428.
13. G. Pesole, M.P. Bozzetti, C. Lanave, G. Preparata, C. Saccone, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 522-526.
14. D. Eisenberg, H.S. Gill, G.M.U. Pfluegl, S.H. Rotstein, *Biochem. Biophys. Acta* **2000**, 1477, 122-145.
15. J. Miranda-Rios, R. Sanchez-Pescador, M. Urdea, A.A. Covarrubias, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 2757-2770.
16. G. Harth, M.A. Horwitz, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22728-22735.
17. C.A. Janson, P.S. Kayne, R.J. Almassy, M. Grunstein, D. Eisenberg, *Gene* **1986**, 46, 297-300.
18. G.H. Miao, B. Hirel, M.C. Marsolier, R.W. Ridge, D.P.S. Verma, *Plant Cell* **1991**, 3, 11-22.
19. S. Tingey, F. Tsai, J. Edwards, E. Walker, G.M. Coruzzi, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 9651-9657.

20. L. van de Zande, W. Labruyere, M. Smaling, A. Moorman, R.H. Wilson, R. Charles, W.H. Lamers, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 7726-7726.
21. C.S. Gibbs, K.E. Campbell, R.H. Wilson, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6293-6293.
22. R.C. Valentine, B.M. Shapiro, E.R. Stadman, *Biochemistry* **1968**, *7*, 2143-2152.
23. T.G. Frey, D. Eisenberg, F.A. Eiserling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 3402-3406.
24. L. Strayer, „Biochemistry”, W.H. Freeman and Company, New York, **1995**.
25. R.J. Almassy, C.A. Janson, R. Hamlin, N. Xuong, D. Eisenberg, *Nature* **1986**, *323*, 304-309.
26. H.S. Gill, G.M.U. Pfluegl, D. Eisenberg, *Biochemistry* **2002**, *41*, 9863-9872.
27. H.S. Gill, D. Eisenberg, *Biochemistry* **2001**, *40*, 903-1912.
28. H.S. Gill, G.M.U. Pfluegl, D. Eisenberg, *Acta Crystallographica D-Biol. Cryst.* **1999**, *55*, 865-868.
29. S.H. Liaw, G. Jun, D. Eisenberg, *Biochemistry* **1994**, *33*, 11184-11188.
30. S.H. Liaw, J.J. Villafranca, D. Eisenberg, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7999-8003
31. M.M. Yamashita, R.J. Almassy, C.A. Janson, D. Cascio, D. Eisenberg, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17681-17690.
32. S.H. Liaw, D. Eisenberg, *Biochemistry* **1994**, *33*, 675-681.
33. S.H. Liaw, C. Pan, D. Eisenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4996-5000.
34. J. Greenberg, N. Lichtenstein, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 2337.
35. L. Lewintow, A. Meister, E.L. Kuff, G.L. Hogeboom, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 5304.
36. G. Denes, *Biochim. Biophys. Acta* **1954**, *15*, 296-297.
37. A. Meister, *Enzymes* **1962**, *6*, 443.
38. M. Cohen, *Biochemistry* **1963**, *2*, 623-629.
39. C. Monder, *Biochemistry* **1965**, *4*, 2677-2686.
40. B.M. Shapiro, A. Ginsburg, *Biochemistry* **1968**, *7*, 2153-2177.
41. M.D. Denton, A. Ginsburg, *Biochemistry* **1969**, *8*, 1714-1723.
42. R.H. Haschemeyer, *Trans. New York Acad. Sci.* **1968**, *30*, 875-891.
43. M. Carlson, A. Carlson, *Trends Nuerosci.* **1990**, *13*, 272-273.
44. J. Hardy, R. Cowburn, *Trends Neurosci.* **1987**, *10*, 406-406.
45. M.D. Norenberg, *J. Histochem. Cytochem.* **1979**, *27*, 756-762.

46. P.R. Krishnaswamy, V. Pamiljans, A. Meister, *J. Biol. Chem.* **235**, 1960, PC39.
47. J.E. Willis, *Biochemistry* **1966**, 5, 3557-3563.
48. J. Vorhaben, L. Wong, J. Campbell, *Biochem. J.* **1973**, 135, 893-896.
49. M.L. Rueppel, S.L. Lundr, J.D. Gass, A. Meister, *Biochemistry* **1972**, 11, 2839-2844.
50. L. Lewintow, A. Meister, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 3039-3040.
51. L. Lewintow, A. Meister, *J. Biol. Chem.* **1954**, 209, 265-280.
52. H.M. Kagan, L.R. Manning, A. Meister, *Biochemistry* **1965**, 4, 1063-1068.
53. H.M. Kagan, A. Meister, *Biochemistry* **1966**, 5, 725-732.
54. H.M. Kagan, A. Meister, *Biochemistry* **1966**, 5, 2423-2432.
55. A. Meister, *Adv. Enzymol.* **1968**, 31, 183.
56. E. Khedouri, V.P. Wellner, A. Meister, *Biochemistry* **1964**, 3, 824-828.
57. F. Khedouri, A. Meister, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 3357-3360.
58. V.P. Wellner, M. Zoukis, A. Meister, *Biochemistry* **1966**, 5, 3509-3514.
59. J.D. Gass, A. Meister, *Biochemistry* **1970**, 9, 1380-1390.
60. J.D. Gass, A. Meister, *Biochemistry* **1970**, 9, 842-846.
61. R.A. Stephani, W.B. Rowe, J.D. Gass, A. Meister, *Biochemistry* **1972**, 11, 4094-4100.
62. Y. Tsuda, R.A. Stephani, A. Meister, *Biochemistry* **1971**, 10, 3186-3189.
63. M.R. Maurizi, A. Ginsburg, *Biochemistry* **1986**, 25, 131-140.
64. M.R. Maurizi, P.G. Kasprzyk, A. Ginsburg, *Biochemistry* **1986**, 25, 141-151.
65. J.R. Hunt, P.Z. Smyrniotis, A. Ginsburg, E.R. Stadtman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1975**, 166, 102-124.
66. E.J. Whitley, A. Ginsburg, *J. Biol. Chem.* **1980**, 266, 10663-10670.
67. C.A. Woolfolk, E.R. Stadtman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**, 1964, 313-322.
68. C.A. Woolfolk, E.R. Stadtman, *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 1967, 736-755.
69. F.W. Dahlquist, D.L. Purich, *Biochemistry* **1975**, 14, 1980-1989.
70. S.P. Adler, D.L. Purich, E.R. Stadtman, *J. Biol. Chem.*, **250**, 1975, 6264-6272.
71. P.B. Chock, R.R. Stadtman, *Meth. Enzymol.* **64**, 1980, 397-425.
72. T.F. Deuel, S. Prusiner, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 257-264.
73. R. Fisher, R. Tuli, R. Haselkorn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 3393-3397.

74. M. Garcia-Dominguez, J.C. Reyes, F.J. Florencio, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7161-7166.
75. M. Garcia-Dominguez, J.C. Reyes, F.J. Florencio, *Molec. Microbiol.* **2000**, *35*, 1192-1201.
76. M.I. Muro-Pastor, F.N. Barrera, J.C. Reyes, F.J. Florencio, J.L. Neira, *Protein Sci.* **2003**, *12*, 1443-1454.
77. J. Pace, E.E. McDermott, *Nature* **1952**, *169*, 415.
78. H. Bentley, E. McDermott, J.J.K.W. Pace, T.Moran, *Nature* **1949**, *164*, 438-439.
79. R.A. Ronzio, A. Meister, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *59*, 164-170.
80. R.A. Ronzio, W.B. Rowe, A. Meister, *Biochemistry* **1969**, *8*, 1066-1075.
81. R.A. Ronzio, W.B. Rowe, S. Wilk, A. Meister, *Biochemistry* **1969**, *8*, 2670-2674.
82. J.M. Manning, S. Moore, W.B. Rowe, A. Meister, *J. Biol. Chem.* **1969**, *8*, 2681-2685.
83. A. Shrake, A. Ginsburg, F.C. Wedler, Y. Sugiyama, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 8238-8243.
84. E.G. Gorman, A. Ginsburg, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 8244-8252.
85. W.B. Rowe, A. Meister, *Biochemistry* **1973**, *12*, 1578-1582.
86. T.D. Meek, J.J. Villafranca, *Biochemistry* **1980**, *19*, 5513-5519.
87. O.W. Griffith, A. Meister, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 2333-2338.
88. O.W. Griffith, M.E. Anderson, A. Meister, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 1205-1210.
89. P. Mastalerz, *Arch. Immun. Ter. Dośw.* **1959**, *7*, 201.
90. E. Bayer, K.H. Gugel, K. Hägele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W.A. Köonig, H. Zähner, *Helv. Chim. Acta* **1972**, *55*, 224-239.
91. Y. Ogawa, T. Tsuruoka, S. Inoue, T. Niida, *Meiji Seika Kenkyu Nempo* **1973**, *13*, 42.
92. D.M. Walker, J.F. McDonald, E.W. Logush, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1987**, 1710-1711.
93. J.A. Colanduoni, J.J. Villafranca, *Bioorg. Chem.* **1986**, *14*, 163-169.
94. L.M. Abell, J.J. Villafranca, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6135-6141.
95. B. Lejczak, H. Strzemska, P. Mastalerz, *Experientia* **1981**, *37*, 461-462.
96. E.W. Logush, D.M. Walker, J.F. McDonald, J.E. Franz, *Biochemistry* **1989**, *29*, 3043-3051.

97. D.M. Walker, J.F. McDonald, J.E. Franz, E.W. Logush, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 659-666.
98. C.R. Johnson, B.R. Boettcher, R.E. Cherpeck, M.G. Dolson, *Bioorg. Chem.* **1990**, *18*, 154-159.
99. E.W. Logush, D.M. Walker, J.F. McDonald, J.E. Franz, *Plant. Physiol.* **1991**, *95*, 1057-1062
100. G.K. Farrington, A. Kumar, F.C. Wedler, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 2062-2067.
101. P.J. Lea, S.M. Ridley, *Soc. Exp. Biol. Semin. Ser.* **1989**, *38*, 137-170.
102. F.C. Wedler, B.R. Horn, W.G. Roby, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *202*, 482-490.
103. N.A. Firsova, K.M. Selivanova, L.V. Alekseeva, Z.G. Evstigneeva, *Biokhimiya* **1986**, *51*, 850-855.
104. M.A. Acaster, P.D.J. Weitzman, *FEBS Lett.* **1985**, *189*, 241-244.
105. P.L. Langston-Unkefer, P.A. Macy, R.D. Durbin, *Plant Physiol.* **1984**, *76*, 71-74.
106. S.J. Anandaraj, H.N. Jayaram, D.A. Cooney, A.K. Tyagi, N. Han, J.H. Thomas, M. Chitnis, J.A. Montgomery, *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1980, 227-245.
107. S. Omura, M. Murata, N. Imamura, Y. Iwai, H. Tanaka, A. Furusaki, T. Matsumoto, *J. Antibiot.* **37**, 1984, 1324-1332.
108. S. Fushiya, K. Maeda, T. Funayama, S. Nozoe, *J. Med. Chem.* **31**, 1988, 480-483.
109. M.J. Rogers, J.C. Frith, S.P. Luckman, F.P. Coxon, H.L. Benford, J. Monkkonen, S. Auriola, K.M. Chilton and R.G.G. Russell, *Bone* **1999**, *24*, 73S-79S.
110. D.E. Hughes, M. Mian, D.F. Guillard-Cumming and R.G.G. Russell, *Drugs Exp. Clin. Res.* **1991**, *17*, 109.
111. R.E. Coleman, *Ann. Ocol.* **2000**, *11*, 179.
112. J.H. Lin, *Bone* **1996**, *18*, 75-85.
113. F. Suzuki, Y. Fijikawa, S. Yamamoto, H. Mizutani, T. Ohya, T. Ikai, T. Oguchi, Y. Ohiai, K. Nakahara, *Jpn. Kokai Tukkyo Koho* **1979**, *79*, 829, *Chem Abstr* **1980**, *91*, 103762h.
114. F. Suzuki, Y. Fijikawa, S. Yamamoto, H. Mizutani, T. Ohya, T. Ikai, T. Oguchi, *T. Ger. Offen.* **1979**, *2*, 578.

115. H. Hudson, Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids and their Derivatives as Agrochemicals, w: V.H. Kukhar and H.R. Hudson, (Eds.) „Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids: Chemistry and Biological Activity”, strony: 443-474, Wiley & Sons, Chichester **2000**.
116. P. Kafarski, B. Lejczak, G. Forlani, *Heteroatom Chem.* **2000**, *11*, 449-453.
117. B. Lejczak, B. Boduszek, P. Kafarski, G. Forlani, H. Wojtasek, P. Wieczorek, *J. Plant Growth Regul.* **1996**, *15*, 109-113.
118. G. Forlani, P. Kafarski, B. Lejczak, B. Boduszek, R. Ganczarz, C. Torreilles, J. Sołoducho, H. Wojtasek, J. Hafner, J. Korf and P. Wieczorek, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon* **1996**, *109*, 353-356.
119. P. Kafarski, B. Lejczak, G. Forlani, R. Ganczarz, C. Torreilles, J. Grembecka, A. Ryczek and P. Wieczorek, *J. Plant Growth Regul.* **1997**, *16*, 153-158.
120. G. Forlani, P. Kafarski and B. Lejczak, *Pest. Biochem. Physiol.* **1996**, *55*, 180-188.
121. G. Forlani, P. Kafarski, B. Lejczak and P. Wieczorek, *J. Plant Growth Regul.* **1997**, *16*, 147.
122. A.L. Chuiko, M.O. Lozinsky, I. Jasicka-Misiak and P. Kafarski, *J. Plant Growth Regul.* **1999**, *18*, 171-174.
123. G. Forlani, B. Lejczak and P. Kafarski, *J. Plant Growth Regul.* **1999**, *18*, 73-79.
124. V. Oberhauser, J. Gaudin, R. Fonne-Pfister and H-P. Schär, *Pest. Biochem. Physiol.* **1998**, *60*, 111-117.
125. T. H. Cromartie, K.J. Ficher and J.N. Grossman, *Pest. Biochem. Physiol.* **1999**, *63*, 114.
126. E. van Beek, E. Pieterman, L. Cohen, C. Lowik, S. Papapoulos, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *264*, 108-111.
127. E. van Beek, E. Pieterman, L. Cohen, C. Löwik and S. Papapoulos, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 491-494.
128. M.B. Martin, W. Arnold, H.T. Heath, J.A. Urbina and E. Oldfield, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263*, 754-758.
129. G. Forlani, B. Lejczak, P. Kafarski, *Aust. J. Plant Physiol.* **2000**, *27*, 677-683.
130. F. Schwerdtle, H. Bieringer, M. Finke, *Z. Pflanzenkrankheiten Pflanzenschutz* **1981**, 431-440.
131. W. Bübl, P. Langelüddecke, *Der Dt Weinbau* **1984**, *18*, 850-851.

132. K. Tachibana, T. Watanabe, Y. Sekizawa, T. Takematsu, *J. Pest. Sci.* **1986**, *11*, 33-37.
133. S.G. Platt, G.E. Anthon, *Plant Physiol.* **1981**, *67*, 509-513.
134. M. Leason, D. Cunliffe, D. Parkin, P.J. Lea, B.J. Miflin, *Phytochemistry* **1982**, *21*, 855-857.
135. P.J. Lea, K.W. Joy, J.L. Ramos, M.G. Guerrero, *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1-6.
136. A. Wild, R. Manderscheid, *Z. Naturforsch* **1984**, *39c*, 500-504.
137. P.J. Langston-Unkefer, A.C. Robinson, T.J. Knight, R.D. Durbin, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 1608-1613.
138. K. Tachibana, *Pest. Sci. Biotech.* **1987**, 145-148.
139. H. Köcher, *Aspects Applied Biol.* **1983**, *4*, 227-234.
140. A. Wild, H. Sauer, W. Rühle, *Z. Naturforsch* **1987**, *42c*, 263-269.
141. H. Sauer, A. Wild, W. Rühle, *Z. Naturforsch* **1987**, *42c*, 270-278.
142. R.D. Blackwell, A.J.S. Murray, P.J. Lea, *J. Exp. Bot.* **1987**, *38*, 1799-1809.
143. M.N. Sivak, P.J. Lea, R.D. Blackwell, A.J.S. Murray, N.P. Hall, A.C. Kendall, J.C. Turner, R.M. Wallsgrove, *J. Exp. Bot.* **1988**, *39*, 655-666.
144. C. Wendler, M. Barniske, A. Wild, *Photosynthesis Res.* **1990**, *24*, 55-61.
145. P. Rey, G. Peltier, *Plant Physiol.* **1989**, *89*, 762-767.
146. M. Lacuesta, A. Munoz-Rueda, C. Gonzales-Murua, M. Sivak, *J. Exp. Bot.* **1992**, *43*, 159-165.
147. C. Wendler, A. Putzer, A. Wild, *J. Plant Physiol.* **1992**, *139*, 666-671.
148. P.F. Morris, D.B. Layzell, D.T. Canvin, *Plant Physiol.* **1989**, *89*, 498-500.
149. R.M. Wallsgrove, J.C. Turner, N.P. Hall, A.C. Kendall, S.W.J. Bright, *Plant Physiol.* **1987**, *83*, 155-158.
150. B. Gonzalez-Moro, M. Lacuesta, J.M. Becerril, C. Gonzalez-Murua, A. Munoz-Rueda, *J. Plant Physiol.* **1997**, *150*, 388-394.
151. G. Donn, E. Tischer, J.A. Shmith, H.M. Goodman, *J. Mol. Appl. Genet.* **1984**, *2*, 621-635.
152. C.J. Thompson, N.R. Movva, R. Tizard, R. Carameri, J.E. Davies, *EMBO J.* **1987**, *6*, 2519-2523.
153. M. De Block, J. Botterman, M. Vandewiele, J. Dockx, C. Thoen, V. Gossele, N. Rao Movva, C.J. Thompson, M. Van Montagu, J. Leemans, *EMBO J.* **1987**, *6*, 2513-2518.

154. W. De Greef, R. Delon, M. De Block, J. Leemans, J. Botterman, *Biotechnology* **1988**, 7, 61-64.
155. C.W. Gouding, L.J. Perry, D. Anderson, M.R. Sawaya, D. Cascio, M.I. Apostol, S. Chan, A. Parseghian, S.S. Wang, Y. Wu, V. Cassano, H.S. Gill, D. Eisenberg, *Biophys. Chem.* **2003**, 105, 361-370.
156. M.V. Tullius, G. Harth, M.A. Horwitz, *Infection and Immunity* **2001**, 69, 6348-6363.
157. G. Harth, D.L. Clemens, M.A. Horwitz, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 9342-9346.
158. G. Harth, M.A. Horwitz, *J. Exp. Med.* **1999**, 189, 1425-1435.
159. M.V. Tullius, G. Harth, M.A. Horwitz, *Infection and Immunity* **2003**, 71, 3927-3936.
160. G. Harth, P. C. Zamecnik, J. Y. Tang, D. Tabatadze, M.A. Horwitz, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 418-423.
161. G. Harth, M.A. Horwitz, *Infection and Immunity* **2003**, 71, 456-464.
162. H.J. Böhm, *J. Comput. Aided Molec. Des.* **1992**, 6, 593.
163. H.J. Böhm, *J. Comput. Aided Molec. Des.* **1992**, 6, 61.
164. H.J. Böhm, *J. Comput. Aided Molec. Des.* **1994**, 8, 243.
165. J. Grembecka, 'Inhibitory leucyloaminopeptydazy', praca doktorska, Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii, Politechnika Wrocławska, Wrocław. **2000**.
166. D.G. Higgins, A.J. Bleasby and R. Fuchs, *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)* **1992**, 8, 189.
167. J.D. Thompson, D.G. Higgins, and T.J. Gibson, *Nucleic Acids Research* **1994**, 22, 4673.
168. F. Grams, V. Dive, A. Yiotakis, I. Yiallourous, S. Vassiliou, R. Zwillig, W. Bode, W. Stocker, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 671-675.
169. K.B. Yatzymirsky, L.W. Tzymbal, E.I. Synyavskaya, G.A. Buknyevskaya, I.L. Odyntetz, R.M. Kalyanova, T.A. Mastryukova, M.I. Kabatchnik, *Zh. Nieorg. Khim.* **1989**, 34, 112.
170. Insight 2000, Molecular Modelling Program Package, Accelrys **2000**.
171. Sybyl v.6.9.1, Discovery Software, Tripos Inc. **2003**.
172. DISCOVER, Molecular Modelling Program Package, Accelrys **2000**.
173. M. Itoh, *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, 17, 1679.

174. D.H.R. Barton, D. Crich, W.B. Motherwell, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 4979-4982.
175. D.H.R. Barton, Y. Herve, P. Potier, J. Thierry, *Tetrahedron* **1988**, 44, 5379-5486.
176. M.J. Thompson, A. Mekhalfia, D.P. Hornby, G.M. Blackburn, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 7467-7473.
177. J. Tsanaktsidis, P.E. Eaton, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 6967-6968.
178. T. Koch, O. Buchardt, *Synthesis* **1993**, 1065-1067.
179. P.H. Boyle, A.P. Davis, K.J. Dempsey, G.D. Hosken, *Tetrahedron Asymm.* **1995**, 6, 2819-2828.
180. S.R. Angle, R.M. Henry, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7490-7497.
181. K. Jost, J. Rudinger, *Colect. Czech. Chem. Comm.* **1967**, 32, 2485-2490.
182. Z. Prochazka, J. Smolikova, P. Malon, K. Jost, *Colect. Czech. Chem. Comm.* **1981**, 46, 2935-2946.
183. E.A. Boyd, M. Corless, K. James, A.C. Regan, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2933-2936.
184. E.A. Boyd, A.C. Regan, K. James, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 813-816.
185. E.A. Boyd, A.C. Regan, K. James, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4223-4226.
186. E.A. Boyd, M.E.K. Boyd, V.M. Loh Jr., *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1651-1654.
187. E.A. Boyd, M.E.K. Boyd, F. Kerrigan, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5425-5426.
188. E.K. Baylis, C.D. Campbell, J.G. Dingwall, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1984**, 2845-2853.
189. P.P. McCleery, B. Tuck, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, 1319-1329.
190. H.-J. Cristau, A. Coulombeau, A. Genevois-Borella, J.-L. Pirat, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 4491-4494.
191. H.-J. Cristau, A. Coulombeau, A. Genevois-Borella, F. Sanchez, J.-L. Pirat, *J. Organomet. Chem.* **2002**, 643-644, 381-391.
192. J.G. Dingwall, J. Ehrenfreund, R.G. Hall, *Tetrahedron* **1989**, 45, 3787-3808.
193. R. Hamilton, B. Walker, B.J. Walker, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4451-4454.
194. W.P. Malachowski, J.K. Coward, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7616-7624.
195. W.P. Malachowski, J.K. Coward, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7625-7634.
196. S. Chen, J.K. Coward, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 502-509.

197. N. Valiaeva, D. Bartley, T. Konno, J.K. Coward, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5146-5154.
198. D. Georgiadis, M. Matziari, S. Vassiliou, V. Dive, A. Yiotakis, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 14635-14648.
199. D. Georgiadis, V. Dive, A. Yiotakis, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6604-6610.
200. E.W. Logush, D.R. Dukeshener, K.M. Getman, J.E. Franc, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2711-2714.
201. R.M. Valerio, P.F. Alewood, R.B. Johns, *Synthesis* **1988**, *10*, 786-791.
202. Y. Satoh, C. Powers, L.M. Toledo, T.J. Kowalski, P.A. Peters, E.F. Kimble, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 68-75.
203. R.F. Jackson, R.J. Moore, C.S. Dexter, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7875-7884
204. Gaussian 03, Revision B.05, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pope, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **2003**.
205. Brookhaven Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>.
206. L.C. Tarshis, P.J. Proteau, B.A. Kellogg, J.C. Sacchettini, C.D. Poulter, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 15018-15023.
207. I.A. Shumilin, R.H. Kretsinger, R.H. Bauerle, *Structure (London)* **1999**, *7*, 865-875.
208. I.A. Shumilin, R.H. Kretsinger, R.H. Bauerle, *Proteins: struct., funct.* **1996**, *24*, 404-406.

209. T. Wagner, I.A. Shumilin, R. Bauerle and R.H. Kretsinger, *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 389-399.
210. B. Szefczyk, PotentialOnSurface script, User Guide, Wrocław, **2003**.
211. The Visualisation ToolKit, www.vtk.org.
212. R. Hirschmann, K.M. Yager, C.M. Taylor, J. Witherington, P.A. Sprengeler, B.W. Phillips, W. Moore, A.B. Smith III, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8177-8190.
213. N.A. Kashina, I.A. Polyakova, A.V. Kessenikh, B.V. Zhadanov, M.V. Rudomino, *Zh. Obshch. Khim.* **1985**, *55*, 534-538.
214. M. Hariharan, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 470-473.
215. M. Hoffman, C. Wasilewski, *Rocz. Chem.* **1976**, *50*, 139-146.
216. A. Mucha, P. Kafarski, F. Plenat, H-J. Cristau, *Phosphorus Sulphur Rel. Elem.* **1995**, *105*, 187-194.
217. K. Yamanuchi, S. Ohtsuki, M. Kinoshita, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1158-1163.
218. H. Kakinuma, K. Shimazaki, N. Takahashi, S. Niihata, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2559-2572.
219. G. Oesapay, J. Szilaggi, J. Seres, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 2977-2984.

