

## **Fosfonowe analogi aminokwasów aromatycznych zawierające w pierścieniu fenylowym atomy fluoru – inhibitory wybranych enzymów**

**Weronika Wanat**

### **Streszczenie**

Kwasy aminofosfonowe, definiowane są jako fosforowe mimetyki aminokwasów, w których grupa karboksylowa zastąpiona jest ugrupowaniem fosfonowym. Stanowią one jedną z najbardziej eksploatowanych rodzin związków fosforoorganicznych wykorzystywanych do manipulowania szlakami biologicznymi w organizmach żywych. Wprowadzenie grupy fosfonowej wpływa znacząco na właściwości całej cząsteczki. Najbardziej istotną modyfikacją, z punktu widzenia chemii medycznej, jest tetraedryczny kształt fosforowego fragmentu mimetyka w stosunku do płaskiej grupy karboksylowej. Zmiana ta warunkuje zdolność do naśladowania stanu przejściowego reakcji hydrolizy peptydów i wiązań estrowych, co zgodnie z powszechną opinią wpływa na wzrost wiązania takich analogów w centrach aktywnych enzymów hydrolitycznych, a tym samym efektywnie blokuje ich kataboliczne funkcje. Podobieństwo to jest zatem bardzo pożądaną cechą w poszukiwaniu nowych inhibitorów proteinaz i esteraz wykazujących zdolność regulowania czynności metabolicznych [1,2]. Fosfonowe analogi naturalnie występujących aminokwasów i ich pochodne wyróżniają różnorodnością zastosowań biologicznych. Wysoka aktywność determinuje szereg zastosowań przede wszystkim w obszarze chemii medycznej, jak i agrochemii - posiadają one właściwości przeciwnowotworowe [3,4], przeciwbakteryjne [5,6], przeciwwirusowe [7], przeciwzapalne [8] i antygrzybiczne [9], a także wykazują właściwości pestycydowe [10].

Stosunkowo nowym, ale coraz bardziej widocznym trendem w przemyśle farmaceutycznym okazuje się włączanie atomów fluoru do bioaktywnych molekuł. Dane statystyczne wskazują, że w roku 1970 leki zawierające fluor stanowiły jedynie ok. 2% całkowitej sprzedaży. Natomiast już w 2011 roku ilość istniejących leków i substancji działających jako suplementy diety wzrosła do 25% [11]. Wzrostowa tendencja wprowadzania farmakoforów fluorowych do szkieletu nowych farmaceutyków uwarunkowana jest rozwojem unikalnych właściwości modyfikowanej cząsteczki. Dodatkowo, atom fluoru jest widoczny w widmach  $^{19}\text{F}$  NMR i może być zastosowany jako sonda molekularna do monitorowania mechanizmów działania cząsteczek fizjologicznie aktywnych [12].

Koncepcja badań nad związkami fosforoorganicznymi zawierającymi jeden lub więcej atomów fluoru zyskuje coraz większą popularność. W ostatnich latach wykazano,

że fluorowane aminofosfoniany wykazują aktywność inhibitorową wobec wielu enzymów, jak również posiadają właściwości cytotoksyczne i antybakteryjne [13,14].

Do badań w niniejszej pracy doktorskiej wybrano związki o dobrze znanym szerokim spektrum aktywności biologicznej, wynikającym z ich zdolności do hamowania aktywności wielu enzymów – kwasy  $\alpha$ -aminofosfonowe. Celem pracy była synteza fosfonowych mimetyków aminokwasów aromatycznych posiadających w pierścieniu fenylowym atomy fluoru. Zakładano, że związki posiadające w swojej strukturze dwa farmakofory łatwe do detekcji metodą NMR ( $^{19}\text{F}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR) powinny stanowić sondy molekularne służące do monitorowania struktury miejsc wiążących oraz zmian w budowie centrum aktywnego podczas reakcji enzymatycznej. Analizę wyników badań enzymatycznych wzmocniono badaniami sposobu wiązania otrzymanych inhibitorów metodami modelowania molekularnego.

W niniejszej pracy przedstawiono syntezy trzech serii kwasów  $\alpha$ -aminofosfonowych: analogów fenyloglicyny, fenyloalaniny i homofenyloalaniny, oraz zbadano ich zdolność do hamowania funkcji katalitycznych wobec wybranych enzymów.

Fosfonowe pochodne fenyloglicyny zawierające w pierścieniu aromatycznych fluorowe i inne halogenowe podstawniki otrzymano w wyniku reakcji amidoalkilowania związków trójwartościowego fosforu (kondensacja aldehydu, amidu i trichlorku fosforu) [15,16]. Badanie ich aktywności inhibitorowej wobec amoniakolizazy *L*-fenyloalaniny (wyzolowanej z bulw ziemniaka) wykazały, że związki te zdolne są do efektywnego hamowania katalizowanej przez ten enzym reakcji, gdy zastosowano je na poziomie mikromolarnym. Wyniki modelowania molekularnego dowiodły, że powinowactwo tych związków do enzymu jest ściśle związane z pozycją i typem podstawników w pierścieniu aromatycznym. Ponieważ posiadano zwartą strukturalnie bibliotekę mimetyków fenyloglicyny zbadano również ich aktywność inhibitorową wobec dwóch aminopeptydaz - wyizolowanej z ziaren jęczmienia oraz świńskiej aminopeptydazy N.

Druga część pracy polegała na syntezie fluorowanych w pierścieniu aromatycznym fosfonowych pochodnych fenyloalaniny oraz ewaluacji ich właściwości inhibitorowych wobec świńskiej i ludzkiej aminopeptydazy N. Ludzka aminopeptydaza N uważana jest za cel projektowania związków przeciwnowotworowych, a badania skринingowe często prowadzi się na enzymie wieprzowym, gdyż jest on łatwiej dostępny. Fosfonowe mimetyki fenyloalaniny otrzymano z odpowiednich kwasów fenylooctowych wykorzystując wieloetapową reakcję i nie wydzielając nietrwałych produktów pośrednich - w procesie, który nazwano „*on line*” [17,18,19].

Ostatnią część pracy doktorskiej stanowiła synteza, fluorowanych fosfonowych analogów homofenyloalaniny i fenyloalaniny. Komercyjnie dostępne kwasy homofenylooctowe oraz fenylooctowe podstawione atomami fluoru i bromu w pierścieniu fenylowym konwertowano do aldehydów, które na drodze kondensacji z karbaminianem benzylu oraz fosforem trifenylowym [20,21,22], a następnie reduktywnym usunięciu grup ochronnych umożliwiły otrzymanie fluorowanych kwasów 1-aminofenylopropylo- oraz 1-aminofenyloetylofosfonowych zawierających dodatkowo atomy bromu w różnych pozycjach w pierścieniu aromatycznym.

Uzyskane związki również poddano testom enzymatycznym wobec świńskiej i ludzkiej aminopeptydazy N.

Struktury zsyntezowanych kwasów  $\alpha$ -aminofosfonowych zostały potwierdzone na podstawie widm spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego NMR (jedno- i dwuwymiarowych), spektrometrii mas oraz analitycznego HPLC. W przypadku otrzymania kryształów o odpowiedniej jakości ich budowę zdefiniowano dodatkowo przy użyciu analizy rentgenograficznej.

Analizę wyników aktywności inhibitorowej fosfonowych analogów aminokwasów aromatycznych wobec wybranych enzymów została wzbogacona o symulacje wykonane technikami modelowania molekularnego, co pozwoliło na lepsze zrozumienie sposobów ich wiązania przez wybrane enzymy.

- 
- [1] Oleksyszyn, J. Aminophosphonic and Aminophosphinic Acid Derivatives in the Design of Transition State Analogue Inhibitors: Biomedical Opportunities and Limitations. In *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids. Chemistry and Biological Activity*. In Proceedings of the Kukhar, V.P., Hudson, H.R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, U.K.; John Wiley & Sons Ltd., 2000; pp. 537–557.
- [2] Kukhar, V.P.; Romanenko, V.D. Chemistry of Aminophosphonic Acids and Phosphonopeptides. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2010; Vol. 2, pp. 189–260.
- [3] Fang, Y.-L.; Wu, Z.-L.; Xiao, M.-W.; Tang, Y.-T.; Li, K.-M.; Ye, J.; Xiang, J.-N.; Hu, A.-X. One-Pot Three-Component Synthesis of Novel Diethyl((2-oxo-1,2-dihydroquinolin-3-yl)(arylamino)methyl)phosphonate as Potential Anticancer Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 653.
- [4] Bhattacharya, A.K.; Raut, D.S.; Rana, K.C.; Polanki, I.K.; Khan, M.S.; Iram, S. Diversity-oriented synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonates: A new class of potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 146–152.
- [5] Dake, S.A.; Raut, D.S.; Kharat, K.R.; Mhaske, R.S.; Deshmukh, S.U.; Pawar, R.P. Ionic liquid promoted synthesis, antibacterial and in vitro antiproliferative activity of novel  $\alpha$ -aminophosphonate derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2527–2532.
- [6] Hellal, A.; Chafaa, S.; Chafai, N.; Touafri, L. Synthesis, antibacterial screening and DFT studies of series of  $\alpha$ -amino-phosphonates derivatives from aminophenols. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1134*, 217–225.
- [7] Lan, X.; Xie, D.; Yin, L.; Wang, Z.; Chen, J.; Zhang, A.; Song, B.; Hu, D. Novel  $\alpha,\beta$ -unsaturated amide derivatives bearing  $\alpha$ -amino phosphonate moiety as potential antiviral agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4270–4273.
- [8] Romero-Estudillo, I.; Viveros-Ceballos, J.L.; Cazares-Carreño, O.; González-Morales, A.; de Jesús, B.F.; López-Castillo, M.; Razo-Hernández, R.S.; Castañeda-Corral, G.; Ordóñez, M. Synthesis of new  $\alpha$ -aminophosphonates: Evaluation as anti-inflammatory agents and QSAR studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 2376–2386.
- [9] Qin, Y.; Xing, R.; Liu, S.; Yu, H.; Li, K.; Hu, L.; Li, P. Synthesis and antifungal properties of (4-tolyloxy)-pyrimidyl- $\alpha$ -aminophosphonates chitosan derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *63*, 83–91.
- [10] Lejczak, B.; Kafarski, P. Biological Activity of Aminophosphonic Acids and Their Short Peptides. *Top. Heterocycl. Chem.*, **2009**, 31–63.
- [11] Wang, J.; Sánchez-Roselló, M.; Aceña, J.L.; del Pozo, C.; Sorochinsky, A.E.; Fustero, S.; Soloshonok, V.A.; Liu, H. Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001–2011). *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2432–2506.
- [12] Gillis, E.P.; Eastman, K.J.; Hill, M.D.; Donnelly, D.J.; Meanwell, N.A. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8315–8359.
- [13] Kaźmierczak, M.; Koroniak, H. DAST mediated preparation of  $\beta$ -fluoro- $\alpha$ -aminophosphonates. *J. Fluor. Chem.* **2012**, *139*, 23–27.
- [14] Romanenko, V.D.; Kukhar, V.P. Fluorinated phosphonates: Synthesis and biomedical application. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3868–3935.
- [15] Oleksyszyn, J. Amidoalkilowanie związków trójwartościowego fosforu. (Amidoalkylation of trivalent phosphorous compounds). *Pr. Nauk. Inst Chem. Org. Fiz. Politech. Wrocław.*, **1986**, *29*, 1–77.
- [16] Soroka, M. The synthesis of 1-aminoalkylphosphonic acids. A revised mechanism of the reaction of phosphorus trichloride, amides and aldehydes or ketones in acetic acid (Oleksyszyn reaction). *Liebigs Ann. der Chemie* **1990**, *1990*, 331–334.
- [17] Kowalik, J.; Kupczyk-Subotkowska, L.; Mastalerz, P. Preparation of Dialkyl 1-Aminoalkanephosphonates by Reduction of Dialkyl 1-Hydroxyiminoalkanephosphonates with Zinc in Formic Acid. *Synthesis (Stuttg)*. **1981**, *1981*, 57–58.
- [18] Maier, L.; Diel, P.J. Organic phosphorus compounds 97. 1 Synthesis and properties of 1-amino-2-aryl- and 766 2-pyridyl-ethylphosphonic acids and derivatives. *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **1991**, *62*, 15–27.
- [19] Drąg, M.; Grembecka, J.; Pawelczak, M.; Kafarski, P.  $\alpha$ -Aminoalkylphosphonates as a tool in experimental optimisation of P1 side chain shape of potential inhibitors in S1 pocket of leucine- and neutral aminopeptidases. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 764–771.
- [20] Oleksyszyn, J.; Subotkowska, L.; Mastalerz, P. Diphenyl 1-Aminoalkanephosphonates. *Synthesis (Stuttg)*. **1979**, *1979*, 985–986.
- [21] Oleksyszyn, J.; Tyka, R. An improved synthesis of 1-aminophosphonic acids. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 2823–2824.

- 
- [22] Birum, G.H. Urylenediphosphonates. General method for the synthesis of .alpha.-ureidophosphonates and related structures. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 209–213.