

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **227742**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **399613**

(22) Data zgłoszenia: **21.06.2012**

(51) Int.Cl.

C07F 9/40 (2006.01)

C07F 9/6561 (2006.01)

C12N 9/99 (2006.01)

(54) **Pochodne estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych,
sposób wytwarzania pochodnych estrów diarylowych
kwasów 1-aminoalkanofosfonowych oraz ich zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
17.12.2012 BUP 26/12

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.01.2018 WUP 01/18

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL
UNIVERSITÄT ULM, Ulm, DE**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MARCIN SIEŃCZYK, Wrocław, PL
RENATA GRZYWA, Wrocław, PL
TIMO BURSTER, Senden Witzighausen, DE
EWA PIETRUSEWICZ, Wrocław, PL
JÓZEF OLEKSYSZYN, Siechnice, PL
BERNHARD OTTO BOEHM, Ulm, DE
ŁUKASZ WINIARSKI, Zielona Góra, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 227742 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są pochodne estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych, sposób wytwarzania pochodnych estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych oraz ich zastosowanie w diagnostyce medycznej.

Z publikacji Oleksyszyn J., Subotkowska L., Mastalerz P., *Synthesis*, 1979, 985; Oleksyszyn J., Powers J.C., *Biochemistry*, 1991, 30, 485 znane są difenylowe estry kwasów 1-aminoalkanofosfonowych będące strukturalnymi analogami aminokwasów wykazujące zdolność hamowania proteolitycznej aktywności enzymów z rodziny proteaz serynowych. W publikacjach Boduszek B., Brown A.D., Powers J.C., *J Ezym. Inhib.* 1994, 8, 147–158; Sieńczyk M., Oleksyszyn J., *Bioorg Med Chem Lett.*, 2006, 16, 2886; Joossens J., Ali O.M., El-Sayed I., Surpateanu G., Van der Veken P., Lambeir A.M., Setyono-Han B., Foekens J.A., Schneider A., Schmalix W., Haemers A., Augustyns K., *J Med Chem.*, 2007, 50, 6638; Sieńczyk M., Podgórski D., Błażejewska A., Kulbacka J., Saczko J., Oleksyszyn J., *Bioorg Med Chem.*, 2011, 19, 1277; Sieńczyk M., Winiarski Ł., Kasperkiewicz P., Psurski M., Wietrzyk J., Oleksyszyn J. *Bioorg Med Chem Lett.*, 2011, 21, 1310 opisano kilka przykładów fosfonowych analogów aminokwasów, z grupy estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych, które zawierają w swej strukturze podstawione aromatyczne pierścienie fenyłowe jako grupy estrowe.

Katepsyny są enzymami niezbędnymi w procesowaniu antygenów w ścieżce głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II). Za proteolityczny potencjał odpowiadają obecne w przestrzeni endocytarnej trzy klasy proteaz – cysteinowe, aspartylowe i serynowe. Wspólne działanie powyższych proteaz prowadzi do wytworzenia peptydów antygenicznych będących fragmentami antygenów, które po połączeniu z białkami MHC II prezentowane są receptorom CD4 limfocytów T (CD4⁺). Jednakże detekcja proteazy serynowej – katepsyny G w limfocytach B oraz komórkach dendrytycznych jest ograniczona za względu na konieczność używania dużych ilości lizatów komórkowych. Stosując dostępne handlowo niskocząsteczkowe sondy molekularne do wykrywania aktywnej enzymatycznie katepsyny G niezbędne jest stosowanie około 20 µg lizatu w celu określenia obecności aktywnej katepsyny G.

Dotychczas nie zostały opisane w literaturze pochodne estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych według wynalazku, które posiadają właściwości nieodwracalnych i specyficznych inhibitorów proteaz serynowych będących jednocześnie niskocząsteczkowymi sondami molekularnymi, które stosuje się do wykrywania i obrazowania aktywnych enzymatycznie form enzymów tej klasy. Jako specyficzny marker pozwalający na detekcję kompleksów aktywna proteaza-inhibitor stosuje się biotynę. Opisane dotychczas w publikacjach naukowych sondy należące do tej klasy związków nie uwzględniają obecności/wprowadzenia podstawników w obrębie aromatycznych grup estrowych, przez co ich właściwości inhibitorowe są słabsze niż pochodne będące przedmiotem wynalazku.

Istotą wynalazku są pochodne estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych o wzorze ogólnym I, w którym Bt oznacza biotynę, W oznacza łącznik węglowodorowy składający się od 5 do 10 atomów węgla, Y oznacza reszty aminokwasowe w ilości od 0 do 4, R oznacza podstawnik analogiczny do łańcucha bocznego waliny, alaniny, leucyny, fenyloalaniny, 4-guanidynofenyloglicyny lub kwasu 2-aminobutanowego (Abu); X oznacza wodór lub związek wybrany z grupy obejmującej: merkaptometyl (S-metyl), metoksyl (O-metyl) lub karboksymetyl.

Sposób wytwarzania pochodnych estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych o wzorze ogólnym I, w którym Bt oznacza biotynę, W oznacza łącznik węglowodorowy składający się od 5 do 10 atomów węgla, Y oznacza reszty aminokwasowe w ilości od 0 do 4, R oznacza podstawnik analogiczny do łańcucha bocznego waliny, alaniny, leucyny, fenyloalaniny, 4-guanidynofenyloglicyny lub kwasu 2-aminobutanowego (Abu); X oznacza wodór lub związek wybrany z grupy obejmującej: merkaptometyl (S-metyl), metoksyl (O-metyl) lub karboksymetyl polega na tym, że fosforin triarlowy, otrzymany z fenolu zawierającego podstawnik w pozycji *para* oraz chlorku fosforu (III) w acetonitrylu, poddaje się amidoalkilowaniu przy użyciu karbaminianu benzylu, fosforinu triarlowego oraz aldehydu, takiego jak aldehyd octowy, propionowy, izomasłowy, fenylooctowy, *p*-nitrobenzoesowy lub izowalerianowy. Następnie prowadzi się syntezę bromowodorków estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych, w których odblokowuje się ochronną grupę benzyloksykarbonyłową (Cbz) a w kolejnym etapie poddaje się reakcji z aminokwasem z zablokowaną grupą α-aminową w obecności odczynnika sprzęgającego. Z otrzymanego fosfonodipeptydu po usunięciu grupy blokującej *tert*-butoksykarbonyłowej (*t*-Boc) uzyskuje się dipeptyd estru difenylowego kwasu 1-aminoalkano-

fosfonowego, który poddaje się reakcji w obecności odczynnika sprzęgającego w sposób analogiczny do przedstawionego powyżej z kolejnym aminokwasem z zablokowaną grupą α -aminową, biotyną lub jej pochodną.

Korzystnie jako odczynnik sprzęgający stosuje się heksafluorofosforan O-benzotriazol-1-ylo-N,N,N',N'-tetrametylouroniowy (HBTU) w obecności N,N'-diizopropyletyloaminy (DIEA).

Zastosowanie pochodnych estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych o wzorze ogólnym I, w którym Bt oznacza biotynę, W oznacza łącznik węglowodorowy składający się od 5 do 10 atomów węgla, Y oznacza reszty aminokwasowe w ilości od 0 do 4, R oznacza podstawnik analogiczny do łańcucha bocznego waliny, alaniny, leucyny, fenyloalaniny, 4-guanidynofenyloglicyny lub kwasu 2-aminobutanowego (Abu); X oznacza wodór lub związek wybrany z grupy obejmującej: merkaptometyl (S-metyl), metoksyl (O-metyl) lub karboksymetyl do wytwarzania leku będącego inhibitorem proteaz serynowych.

Zastosowanie *in vitro* pochodnych estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych o wzorze ogólnym I, w którym Bt oznacza biotynę, W oznacza łącznik węglowodorowy składający się od 5 do 10 atomów węgla, Y oznacza reszty aminokwasowe w ilości od 0 do 4, R oznacza podstawnik analogiczny do łańcucha bocznego waliny, alaniny, leucyny, fenyloalaniny, 4-guanidynofenyloglicyny lub kwasu 2-aminobutanowego (Abu); X oznacza wodór lub związek wybrany z grupy obejmującej: merkaptometyl (S-metyl), metoksyl (O-metyl) lub karboksymetyl, jako niskocząsteczkowych sond molekularnych do wykrywania aktywnych katalitycznie form enzymów.

Zastosowanie diagnostyczne pochodnych estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych oparte jest na nieodwracalnym sposobie ich wiązania z miejscem aktywnym docelowej proteazy, co pozwala na wyeliminowanie wyników pozytywnych, których źródłem są nieaktywne katalitycznie formy enzymów, co obserwuje się przy zastosowaniu przeciwciał. Dodatkową zaletą jest wysoka specyficzność działania wobec proteaz serynowych i brak reakcji z proteazami innych klas np. proteazami cysternowymi. Po związaniu w miejscu aktywnym docelowej proteazy połączenie pochodnych z białkiem nie ulega rozerwaniu podczas gotowania w obecności dodecylsulfanu sodu oraz β -merkaptoetanolu, dzięki czemu pozwala na obrazowanie kompleksów metodą western blotting. W tym celu, jako czynnika detekcyjnego używa się koniugatów streptawidyna-peroksydaza chrzastowa. Czułość metody pozwala na wykrycie aktywnych form docelowych enzymów w zakresie już od kilku do kilkudziesięciu ng, zarówno w materiale biologicznym takim jak ludzkie komórki krwi jednójądrowe, PBMC czy hodowli komórek bakteryjnych np. *Bacillus subtilis*, jak i w oczyszczonych preparatach białkowych w celu potwierdzenia aktywności wyizolowanych enzymów. Co więcej, zdolność detekcji jest wyższa niż przy zastosowaniu specyficznych wobec enzymów przeciwciał oraz jest znacznie tańsza niż metody immunodetekcyjne.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest w przykładach wytwarzania estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych i określeniu ich właściwości inhibitorowych oraz zastosowaniu w detekcji aktywnych enzymatycznie form wybranych proteaz.

Przykład 1

Sposób wytwarzania estru di-4-metyltiofenyloвого kwasu N-(prolilowalilobiotynylo-1-amino)-2-metylo-propanofosfonowego (Bt-V al-Pro-Val^P(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂, przedstawionego wzorem 1.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu tri-4-tiometylofenyloвого.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się 4,2 g (30 mmol) 4-tiometylofenolu i 20 ml acetonitrylu. Po rozpuszczeniu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 0,87 ml (10 mmol) chlorku fosforu (III). Całość ogrzewa się przez sześć godzin w temperaturze wrzenia. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio bez oczyszczania do reakcji syntezy estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-metylo-propanofosfonowego.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-metylo-propanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn tri-4-tiometylofenylovery powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,51 g (10 mmol) karbaminianu benzylu i 1,1 ml (12 mmol) aldehydu *iso*-butylowego. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 3 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w tempera-

turze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 1,92 g surowego produktu (36% wagowo). Wzór sumaryczny: $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{NO}_5\text{PS}_2$. Masa cząsteczkowa: 531,62 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w CDCl_3 , δ [ppm]): δ 19,45 (s); Widmo ^1H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl_3 , ppm): δ 7,41–6,99 (m, 13H), 5,19–5,06 (m, 3H), 4,65–4,44 (m, 1H), 2,45 (s, 3H, SCH_3), 2,44 (s, 3H, SCH_3), 1,63–1,50 (m, 3H). Analiza MS m/z 503.10/504.18 ($\text{M}+\text{H}^+$). Temperatura topnienia: 103°C .

Etap 3. Otrzymywanie bromowodorku estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,00 g estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu *N*-(benzyl-oksokarbonyl-1-amino)-2-metylo-propanofosfonowego (3,76 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,70 g (95% wagowo) bromowodorku estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego. Wzór sumaryczny: $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{BrNO}_3\text{PS}_2$. Masa cząsteczkowa: 477,02 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w $\text{DMSO}-d_6$, δ [ppm]): δ 15,87 (s); Widmo ^1H NMR (300 MHz, roztwór w $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 1,14 (dd, $J=6,9/11,6$; 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,35 (m, 1H, CH), 4,1 (m, 1H, CHP), 7,07–7,32 (m, 8H, Ar-H), 8,66 (s, 3H, NH_3^+). Temperatura topnienia: 147°C .

Etap 4. Otrzymywanie dipeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 0,95 g (2 mmol) bromowodorku estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego i dodaje się 0,43 g Boc-Pro-OH (2 mmol). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Po 2 minutach dodaje się 0,55 ml trietyloaminy (4 mmol). Po 10 minutach dodaje się 0,76 g (2 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 4:1. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 1,07 g (90% wagowo). Wzór sumaryczny: $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}_2\text{PS}_2$. Masa cząsteczkowa: 594,20 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w CDCl_3 , δ [ppm]): δ 18,59 (s). Widmo ^1H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl_3 , ppm): δ 7,24–7,00 (m, 8H), 4,80–4,63 (m, 1H), 4,43–4,27 (m, 1H), 3,52–3,24 (m, 2H), 2,46–2,43 (m, 6H), 2,33–2,06 (m, 2H), 2,03–1,86 (m, 2H), 1,86–1,74 (m, 1H), 1,72–1,59 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,15–0,96 (m, 6H). $R_f = 0,41$ (CHCl_3 :AcOEt; 4:1, v/v).

*Etap 5. Usunięcie grupy *t*-Boc z pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.*

Do kolby okrągłodennej odważa się pochodną dipeptydową estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego (1,0 g, 1,68 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,98 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania pochodnej tripeptydowej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Etap 6. Otrzymywanie tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Do powstałego w Etapie 5 produktu $\text{TFA}^*\text{Pro-Val}^P(\text{OC}_6\text{H}_4\text{-4-S-CH}_3)_2$ ($m=0,98$ g; 1,66 mmol) dodaje się 0,37 g (1,66 mmol) Boc-Val-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (10 ml). Po upływie 2 minut dodaje się 0,55 ml (4,15 mmola) trietyloaminy. Po 10 minutach dodaje się 0,68 g (1,8 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi

do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Warstwę octanową suszy się siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 1:4. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 1,04 g (90% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{33}H_{48}N_3O_7PS_2$. Masa cząsteczkowa: 693,85 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): 17.94 (s, 47%), 17.56 (s, 53%). Widmo 1H NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 7,25–7,04 (m, 8H), 5,28–5,10 (m, 1H), 4,78–4,68 (m, 1H), 4,67–4,45 (m, 1H), 4,35–4,20 (m, 1H), 3,84–3,43 (m, 2H), 2,49–2,43 (m, 6H), 2,43–1,76 (m, 7H), 1,49–1,36 (m, 9H), 1,15–0,82 (m, 12H). $R_f = 0,21$ ($CHCl_3$: AcOEt; 4:1, v/v).

Etap 7. Usunięcie grupy *t*-butoksykarbonylowej z tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymaną w Etapie 6 pochodną tripeptydową estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego (1,0 g, 1,44 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,94 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania biotynylowanej pochodnej tripeptydowej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Etap 8. Otrzymywanie biotynylowanej tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Powstały w Etapie 7 produkt ($TFA \cdot Val-Pro-Val^P(OC_6H_4-4-S,-CH_3)_2$) (0,94 g, 1,36 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (*N*-metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,33g, 1,36 mmol), a następnie dodaje się diizopropylaminę (DIEA) w ilości 0,48 ml (3,44 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mieszaniny dodaje się 0,57 g (1,50 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylu-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitryl zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,54 g, (38% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{38}H_{54}N_5O_7PS_3$. Masa cząsteczkowa: 820,03 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 23,44 min. Analiza HRMS m/z 842,2820/842,2745 ($M+Na$)⁺.

Przykład 2

Sposób wytwarzania estru difenyloвого kwasu *N*-(prolilowalilbiotynylo-1-amino)-2-metylopropanofosfonowego, ($Bt-Val-Pro-Val^P(O-C_6H_5)_2$), przedstawionego wzorem 2.

Etap 1. Otrzymywanie estru difenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-metylopropanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszałko magnetyczne zawierającej fosforyn trifenylowy (3,10 g, 10 mmol) dodaje się karbaminian benzylu (1,51 g, 10 mmol) i 1,1 ml (10,5 mmola) aldehydu *iso*-butylowego. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 4 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej, a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 2,11 g surowego produktu (48% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{24}H_{26}NO_5P$. Masa cząsteczkowa: 439,44 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 17,81 (s); Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 1,11 (d, $J=6,8$ Hz, 6H), 4,41–4,47 (m, 1H), 4,72 (s, 1H), 5,13 (d, $J=10,6$ Hz, 1H), 5,27 (d, $J=4,1$ Hz, 2H), 7,06–7,40 (m, 15H). Temperatura topnienia: 107°C.

Etap 2. Otrzymywanie bromowodoru estru difenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,00 g estru difenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-metylo-propanofosfonowego (4,55 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny.

Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,34 g (76% wagowo) bromowodorku estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego. Wzór sumaryczny: $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{BrNO}_3\text{P}$. Masa cząsteczkowa: 386,22 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w $\text{DMSO}-d_6$, δ [ppm]): δ 14,74 (s); Widmo ^1H NMR (300 MHz, roztwór w $\text{DMSO}-d_6$, δ [ppm]): δ 1,20 (dd, $J=7,0/22,9$ Hz, 6H), 2,39–2,49 (m, 1H), 4,15 (dd, $J=4,8/15,4$ Hz, 1H), 7,05–7,46 (m, 10H), 8,74 (s, 3H, NH_3^+). Temperatura topnienia: 171°C .

Etap 3. Otrzymywanie dipeptydowej pochodnej estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 0,77 g (2 mmol) bromowodorku estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego otrzymanego w Etapie 2 i dodaje się 0,43 g Boc-Pro-OH (2 mmol). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Po 2 minutach dodaje się 0,55 ml trietyloaminy (4 mmol). Po 10 minutach dodaje się 0,76 g (2 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo- N,N,N',N' -tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 4:1. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,95 g (95% wagowo). Wzór sumaryczny: $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_6\text{N}_2\text{P}$. Masa cząsteczkowa: 502,54 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w CDCl_3 , δ [ppm]): δ 17,45 (s); Widmo ^1H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl_3 , ppm): δ 7,36–7,08 (m, 10H), 4,84–4,63 (m, 1H), 4,45–4,26 (m, 1H), 3,57–3,23 (m, 2H), 2,53–2,33 (m, 2H), 2,31–2,04 (m, 2H), 1,98–1,87 (m, 1H), 1,83–1,64 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,16–0,98 (m, 6H). $R_f = 0,56$ ($\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$; 4:1, v/v).

Etap 4. Usunięcie grupy t-Boc z dipeptydowej pochodnej estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się pochodną dipeptydową estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego (2,05 g, 2 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 1,88 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania pochodnej tripeptydowej estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Etap 5. Otrzymywanie tripeptydowej pochodnej estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Do powstałego w Etapie 4 produktu $\text{TFA}^*\text{Pro-Val}^P(\text{OC}_6\text{H}_5)_2$ (0,83 g; 1,66 mmol) dodaje się 0,37 g (1,66 mmol) Boc-Val-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (10 ml). Po upływie 2 minut dodaje się 0,55 ml (4,15 mmola) trietyloaminy. Po 10 minutach dodaje się 0,68 g (1,8 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo- N,N,N',N' -tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Warstwę octanową suszy się siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 1:4. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,92 g (92% wagowo). Wzór sumaryczny: $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}$. Masa cząsteczkowa: 601,67 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (roztwór w CDCl_3 , δ [ppm]): 17,40 (s, 46%), 17,07 (s, 54%). Widmo ^1H NMR (roztwór w CDCl_3 , δ [ppm]): 7,32–7,09 (m, 10H), 5,39–5,15 (m, 1H), 4,82–4,70 (m, 1H), 4,70–4,45 (m, 1H), 4,34–4,18 (m, 1H), 3,84–3,41 (m, 2H), 2,50–1,75 (m, 7H), 1,48–1,38 (m, 9H), 1,15–0,81 (m, 12H). HRMS m/z 624,2815/624,2795 ($\text{M}+\text{Na}^+$). $R_f = 0,19$ ($\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$; 4:1, v/v).

Etap 6. Usunięcie grupy t-Boc z tripeptydowej pochodnej estru difenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymaną w Etapie 5 pochodną tripeptydową estru difenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego (1,0 g, 1,66 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,88 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania biotynylowanej pochodnej tripeptydowej estru difenyloвого kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego.

Etap 7. Otrzymywanie biotynylowanej tripeptydowej pochodnej estru difenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Powstały w Etapie 6 produkt (TFA*Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂) (0,82 g, 1,36 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (N-metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,33 g, 1,36 mmol), a następnie dodaje się diizopropylaminę (DIEA) w ilości 0,48 ml (3,44 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mieszaniny dodaje się 0,57 g (1,50 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitril zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,29 g, (29% wagowo). Wzór sumaryczny: C₃₆H₅₀N₅O₇PS. Masa cząsteczkowa: 727,85 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 18,81 min. Analiza HRMS *m/z* 750,3066/750,1553 (M+Na)⁺.

Przykład 3

Sposób wytwarzania estru difenyloвого kwasu *N*-(prolilowalilobiotynylo-1-amino)-2-fenyletanofosfonowego, (Bt-V al-Pro-Phe^P(O-C₆H₅)₂), przedstawionego wzorem 3.

Etap 1. Otrzymywanie estru difenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-fenyletanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się fosforin trifenyłowy (3,1 g, 10 mmol), 1,51 g (10 mmol) karbaminianu benzylu i 1,45 g (12 mmol) aldehydu fenylowego. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 3 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 2,73 g surowego produktu (56% wagowo). Wzór sumaryczny: C₂₈H₂₆NO₅P. Masa cząsteczkowa: 487,48 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121 MHz, roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): δ 18,46 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl₃, ppm): δ 2,98–3,48 (m, 2H), 4,82–4,85 (m, 1H), 4,88 (s, 2H), 5,15 (d, J=10,17 Hz, 1H), 7,06–7,29 (m, 20H). Temperatura topnienia: 124,5–125,5°C.

Etap 2. Otrzymywanie bromowodorku estru difenyloвого kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,00 g estru difenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-fenyletanofosfonowego (4,10 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,67 g (94% wagowo) bromowodorku estru difenyloвого kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego. Wzór sumaryczny: C₂₀H₂₁BrNO₃P. Masa cząsteczkowa: 434,26 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 15,31 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, ppm): δ 2,48–2,49 (m, 2H), 4,50–4,55 (m, 1H), 7,04–7,41 (m, 15H), 8,78 (s, 3H).

Etap 3. Otrzymywanie dipeptydowej pochodnej estru difenyloвого kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 0,86 g (2 mmol) bromowodorku estru difenyloвого kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego otrzymanego w Etapie 2 i dodaje się 0,43 g Boc-Pro-OH (2 mmol).

Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Po 2 minutach dodaje się 0,55 ml trietyloaminy (4 mmol). Po 10 minutach dodaje się 0,76 g (2 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 4:1. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,70 g (64% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{30}H_{35}O_6N_2P$. Masa cząsteczkowa: 550,58 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 18,56 (s, 49%), 18,29 (s, 51%). Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 1,22–1,25 (m, 6H), 1,36–1,98 (m, 6H, $3 \times CH_2$), 3,41–3,43 (m, 3H, CH_2 , CH), 4,19–4,21 (m, 1H, NH), 5,18–5,19 (m, 1H, CHP), 7,04–7,67 (m, 15H, aromat.).

Etap 4. Usunięcie grupy t-Boc z dipeptydowej pochodnej estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się pochodną dipeptydową estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego (0,92 g, 1,68 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,69 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania pochodnej tripeptydowej estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego.

Etap 5. Otrzymywanie tripeptydowej pochodnej estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego.

Do powstałego w Etapie 4 produktu $TFA \cdot Pro-Phe^P(OC_6H_5)_2$ (0,91 g; 1,66 mmol) dodaje się 0,37 g (1,66 mmol) Boc-Val-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (10 ml). Po upływie 2 minut dodaje się 0,55 ml (4,15 mmol) trietyloaminy. Po 10 minutach dodaje się 0,68 g (1,8 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Warstwę octanową suszy się siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 1:4. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,25 g (23% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{35}H_{44}N_3O_7P$. Masa cząsteczkowa: 649,71 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 17,35 (s). Widmo 1H NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 0,68–0,72 (m, 6H), 1,20 (s, 9H), 1,50–1,79 (m, 6H), 2,832,86 (m, 1H), 3,14–3,39 (m, 3H), 3,99–4,02 (m, 1H), 5,04–5,06 (m, 1H), 5,16 (s, 1H), 6,87–7,07 (m, 15H).

Etap 6. Usunięcie grupy t-butoksykarbonylowej z tripeptydowej pochodnej estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymaną w Etapie 5 pochodną tripeptydową estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego (0,96 g, 1,48 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,77 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania biotynyłowanej pochodnej tripeptydowej estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego.

Etap 7. Otrzymywanie biotynyłowanej tripeptydowej pochodnej estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego.

Powstały w Etapie 6 produkt $TFA \cdot Val-Pro-Phe^P(OC_6H_5)_2$ (0,88 g, 1,36 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (*N*-metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,33 g, 1,36 mmol), a następnie dodaje się diizopropylaminę (DIEA) w ilości 0,48 ml (3,44 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mie-

szaniny dodaje się 0,57 g (1,50 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitryl zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,42 g, (36% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{40}H_{50}N_5O_7PS$. Masa cząsteczkowa: 775,89 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 26,36 min. Analiza HRMS m/z 776,3247/776,1211 ($M+H$)⁺.

Przykład 4

Sposób wytwarzania estru di-4-metyltiofenyloвого kwasu *N*-(prolilowalilobiotynylo-1-amino)-etanofosfonowego (Bt-Yal-Pro-Ala^P(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂, przedstawionego wzorem 4.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu tri-4-tiometylofenyloвого.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się 4,2 g (30 mmol) 4-tiometylofenolu i 20 ml acetonitrylu. Po rozpuszczeniu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 0,87 ml (10 mmol) chlorku fosforu (III). Całość ogrzewa się przez sześć godzin w temperaturze wrzenia. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio bez oczyszczania do reakcji syntezy estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-etanofosfonowego.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-etanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn tri-4-tiometylofenylovery powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,51 g (10 mmol) karbaminianu benzylu i 1,11 ml (20 mmol) aldehydu octowego. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 3 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 3,07 g surowego produktu (61% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{24}H_{26}NO_5PS_2$. Masa cząsteczkowa: 503,57 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121MHz, roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): δ 19,48 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl₃, ppm): δ 1,17–1,22 (d, *J*=9,0 Hz, 3H), 2,45 (s, 6H), 4,49–4,63 (dd, *J*=9,0/15,0 Hz, 1H), 5,08–5,17 (m, 3H), 6,99–7,35 (m, 13H). Temperatura topnienia: 103°C. Współczynnik *R*_f = 0,65 (CHCl₃:AcOEt, 4:1, v/v).

Etap 3. Otrzymywanie bromowodorku estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,00 g estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-etanofosfonowego (3,97 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,70 g (95% wagowo) bromowodorku estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego. Wzór sumaryczny: $C_{16}H_{21}BrNO_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 450,35 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 16,85 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, ppm): δ 1,49–1,59 (m, 3H), 2,48 (s, 6H), 4,21–4,30 (m, 1H), 7,14–7,32 (m, 8H), 8,76 (s, 3H). Temperatura topnienia: 176°C. Współczynnik *R*_f = 0,31 (CHCl₃:AcOEt, 4:1, v/v).

Etap 4. Otrzymywanie dipeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 0,90 g (2 mmol) bromowodorku estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego i dodaje się 0,43 g Boc-Pro-OH (2 mmol). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Po 2 minutach dodaje się 0,55 ml trietyloaminy (4 mmol). Po 10 minutach dodaje się 0,76 g (2 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego.

Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu.

Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 4:1. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,88 g (78% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{26}H_{35}O_6N_2PS_2$. Masa cząsteczkowa: 566,67 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 19,61 (s); Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 1,19–1,24 (d, $J=15,0$ Hz, 3H), 1,40 (s, 9H), 1,46–1,89 (m, 5H), 2,00 (s, 6H), 3,31–3,40 (m, 2H), 4,28–4,31 (d, $J=6,0$ Hz, 1H), 4,80–4,82 (dd, $J=2,7/3,9$ Hz, 1H), 6,98–7,21 (m, 8H). Współczynnik $R_f = 0,22$ ($CHCl_3$:AcOEt, 4:1, v/v).

Etap 5. Usunięcie grupy t-Boc z pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się pochodną dipeptydową estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego (0,95 g, 1,68 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,75 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania pochodnej tripeptydowej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego.

Etap 6. Otrzymywanie tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego.

Do powstałego w Etapie 5 produktu $TFA \cdot Pro-Ala^P(OC_6H_4-4-S-CH_3)_2$ (0,93g; 1,66 mmol) dodaje się 0,37 g (1,66 mmol) Boc-Val-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (10 ml). Po upływie 2 minut dodaje się 0,55 ml (4,15 mmol) trietyloaminy. Po 10 minutach dodaje się 0,68 g (1,8 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo- N,N,N',N' -tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Warstwę octanową suszy się siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 1:4. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,82 g (74% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{31}H_{44}N_3O_7PS_2$. Masa cząsteczkowa: 665,80 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 19,30 (s, 55%), 19,74 (s, 45%). Widmo 1H NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 0,81–1,12 (m, 10H), 1,43 (s, 9H), 1,50–1,57 (m, 2H), 1,75–2,05 (m, 3H), 2,44 (s, 6H), 3,45–3,79 (m, 2H), 4,19–4,32 (m, 1H), 4,33–4,52 (m, 1H), 4,71–4,88 (m, 1H), 5,10–5,27 (m, 1H), 6,98–7,21 (m, 8H). Współczynnik $R_f = 0,18$ ($CHCl_3$:AcOEt, 1:1, v/v).

Etap 7. Usunięcie grupy t-butoksykarbonylowej z tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymana w Etapie 6 pochodną tripeptydową estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego (0,96 g, 1,44 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,81 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania biotynylowanej pochodnej tripeptydowej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego.

Etap 8. Otrzymywanie biotynylowanej tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego.

Powstały w Etapie 7 produkt $(TFA \cdot Val-Pro-Ala^P(OC_6H_4-4-S-CH_3)_2)$ (0,90 g, 1,36 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (N-metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,33 g, 1,36 mmol), a następnie dodaje się diizopropylaminę (DIEA) w ilości 0,48 ml (3,44 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mieszaniny dodaje się 0,57 g (1,50 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo- N,N,N',N' -tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie

produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitryl zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,42 g, (39% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{36}H_{50}N_5O_7PS_3$. Masa cząsteczkowa: 791,98 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 19,62 min. Analiza HRMS m/z 814,2508/814,2501 ($M+Na$)⁺.

Przykład 5

Sposób wytwarzania estru di-4-O-metylofenyloвого kwasu *N*-(prolilowalilobiotynylo-1-amino)-3-metylobutanofosfonowego, (Bt-Val-Pro-Leu^P(O-C₆H₄-4-O-CH₃)₂, przedstawionego wzorem 5.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu tri-4-metoksyfenyloвого.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się 3,72 g (30 mmol) 4-metoksyfenolu i 20 ml acetonitrylu. Po rozpuszczeniu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 0,87 ml (10 mmol) chlorku fosforu (III). Całość ogrzewa się przez 4 godziny w temperaturze wrzenia.

Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio bez oczyszczania do reakcji syntezy estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-3-metylobutanofosfonowego.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-metoksyfenylów ego kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-3-metylo-butanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn tri-4-metoksyfenylowy powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,51 g (10 mmol) karbaminianu benzylu i 1,30 ml (12 mmol) aldehydu izowalerianowego (3-metylo-butyloвого). Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 3 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 2,41 g surowego produktu (47% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{27}H_{32}NO_7P$. Masa cząsteczkowa: 513,52 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121MHz, roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): δ 19,51 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl₃, ppm): δ 7.43–6.70 (m, 13H), 5.25–5.06 (m, 3H), 4.63–4.45 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 1.90–1.67 (m, 3H), 0.97 (d, J=5.7 Hz). Analiza MS m/z 514,19/514,20 ($M+H$)⁺. Temperatura topnienia: 116–118°C.

Etap 3. Otrzymywanie bromowodorku estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,34 g estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-3-metylo-butanofosfonowego (4,55 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietyloвого do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,84 g (88% wagowo) bromowodorku estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego. Wzór sumaryczny: $C_{19}H_{27}BrNO_5P$. Masa cząsteczkowa: 460,30 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 13,70 (s). Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 0,93–0,97 (m, 6H), 1,92–2,20 (m, 3H), 3,66 (d, J=3.5 Hz, 6H), 4.01 (t, J=5.6 Hz, 1H), 6,62–7,37 (m, 8H), 8,97 (s, 3H). Temperatura topnienia: 159°C.

Etap 4. Otrzymywanie dipeptydowej pochodnej estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 0,92 g (2 mmol) bromowodorku estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-2-metylo-butanofosfonowego otrzymanego w Etapie 2 i dodaje się 0,43 g Boc-Pro-OH (2 mmol). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Po 2 minutach dodaje się 0,55 ml trietyloaminy (4 mmol). Po 10 minutach dodaje się 0,76 g (2 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe

suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 4:1. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 1,04 g (90% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{29}H_{41}O_8N_2P$. Masa cząsteczkowa: 576,62 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 19,00 (s). Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 0,85–0,90 (m, 6H), 1,37 (s, 9H), 1,65–1,90 (m, 7H), 3,50–3,55 (m, 2H), 3,60 (d, $J=3,5$ Hz, 6H), 4,30–4,34 (m, 1H), 5,20–5,25 (m, 1H), 6,72–7,19 (m, 8H). Temperatura topnienia: 96°C.

Etap 5. Usunięcie grupy t-Boc z pochodnej estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się pochodną dipeptydową estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego (0,97 g, 1,68 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,84 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania pochodnej tripeptydowej estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Etap 6. Otrzymywanie tripeptydowej pochodnej estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do powstałego w Etapie 5 produktu $TFA^*Pro-Leu^P(OC_6H_4-4-O-CH_3)_2$ (0,95 g; 1,66 mmol) dodaje się 0,37g (1,66 mmol) Boc-Val-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (10 ml). Po upływie 2 minut dodaje się 0,55 ml (4,15 mmol) trietyloaminy. Po 10 minutach dodaje się 0,68 g (1,8 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo- N,N,N',N' -tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Warstwę octanową suszy się siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 1:4. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,84 g (75% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{34}H_{50}N_3O_9P$. Masa cząsteczkowa: 675,75 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 19,83 (s, 55%), 19,55 (s, 45%). Widmo 1H NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 0,92–0,98 (m, 12H), 1,36 (s, 9H), 1,60–2,10 (m, 8H), 3,62–3,68 (m, 2H), 3,69 (s, 6H), 4,22–4,25 (m, 1H), 4,44–4,47 (m, 1H), 4,59–4,81 (m, 1H), 5,28 (d, $J=9,3$ Hz, 1H), 6,70–7,19 (m, 4H). Temperatura topnienia: 62°C. HRMS m/z 698,3182/698,3039 (M^+Na^+).

Etap 7. Usunięcie grupy t-butoksykarbonylowej z tripeptydowej pochodnej estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymaną w Etapie 6 pochodną tripeptydową estru di-4-metoksy fenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego (1,0 g, 1,48 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,92 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania biotynylowanej pochodnej tripeptydowej estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Etap 8. Otrzymywanie biotynylowanej tripeptydowej pochodnej estru di-4-metoksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Powstały w Etapie 7 produkt ($TFA^*Val-Pro-Leu^P(OC_6H_4-4-O-CH_3)_2$) (0,92 g, 1,36 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (N-metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,33 g, 1,36 mmol), a następnie dodaje się diizopropylloaminę (DIEA) w ilości 0,48 ml (3,44 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mieszaniny dodaje się 0,57 g (1,50 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo- N,N,N',N' -tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitryl zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18.

Fracje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,30 g, (28% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{39}H_{56}N_5O_9PS$. Masa cząsteczkowa: 801,93 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%-95% MeCN/45min): 26,22 min. Analiza HRMS m/z 824,3434/824,1826 ($M+Na$)⁺.

Przykład 6

Sposób wytwarzania estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu *N*-(prolilowalilobiotynylo-1-amino)-2-fenyloetanofosfonowego, (Bt-V al-Pro-Phe^P(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂, przedstawionego wzorem 6.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu tri-4-tiometylofenyloвого.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się 4,2 g (30 mmol) 4-tiometylofenolu i 20 ml acetonitrylu. Po rozpuszczeniu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 0,87 ml (10 mmol) chlorku fosforu (III). Całość ogrzewa się przez sześć godzin w temperaturze wrzenia. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio bez oczyszczania do reakcji syntezy estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-fenyloetanofosfonowego.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-fenyloetanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn tri-4-tiometylofenyloвого powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,51 g (10 mmol) karbaminianu benzylu i 1,45 g (12 mmol) aldehydu fenylooctowego. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 3 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 2,37 g surowego produktu (41% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{30}H_{30}NO_5PS_2$. Masa cząsteczkowa: 579,67 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121MHz, roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): δ 18,98 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl₃, ppm): δ 2,40 (d, J=6.5 Hz, 6H), 2,90–3,36 (m, 2H), 4,70–4,79 (m, 1H), 4,93 (s, 2H), 5,07 (d, J=10.9 Hz, 1H), 6,69–7,28 (m, 18H). Temperatura topnienia: 97–99°C.

Etap 3. Otrzymywanie bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-fenyloetanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,00 g estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-fenyloetanofosfonowego (3,45 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,63 g (90% wagowo) bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-fenyloetanofosfonowego. Wzór sumaryczny: $C_{22}H_{25}BrNO_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 526,45 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 15.55 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, ppm): δ 2,35 (d, J=7,4 Hz, 6H), 3,23–3,28 (m, 2H), 4,44–4,48 (m, 1H), 6,90–7,36 (m, 13H), 8,76 (s, 3H).

Etap 4. Otrzymywanie dipeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-fenyloetanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 1,05 g (2 mmol) bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-fenyloetanofosfonowego otrzymanego w Etapie 3 i dodaje się 0,43 g Boc-Pro-OH (2 mmol). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Po 2 minutach dodaje się 0,55 ml trietyloaminy (4 mmol). Po 10 minutach dodaje się 0,76 g (2 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu.

Warstwę octanową przemycza się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w sto-

sunku objętościowym 4:1. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,91 g (71% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{32}H_{39}O_6N_2PS_2$. Masa cząsteczkowa: 642,77 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w $CDCl_3$ δ [ppm]): δ 18,24 (s), 18,16 (s). Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 1.40 (s, 9H), 1,65–1,90 (m, 4H), 2,35 (s, 6H), 3,40–3,54 (m, 4H), 4,124,15 (m, 1H), 5,00–5,10 (m, 1H), 5,19 (s, 1H), 6,94–7,18 (m, 13H). Temperatura topnienia: 49–52°C.

Etap 5. Usunięcie grupy t-Boc z dipeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-feniloetanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się pochodną dipeptydową estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-feniloetanofosfonowego (1,08 g, 1,68 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,92 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania pochodnej tripeptydowej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-feniloetanofosfonowego.

Etap 6. Otrzymywanie tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-feniloetanofosfonowego.

Do powstałego w Etapie 5 produktu $TFA^*Pro-Phe^P(OC_6H_4-4-S-CH_3)_2$ (1,06 g; 1,66 mmol) dodaje się 0,37 g (1,66 mmol) Boc-Val-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (10 ml). Po upływie 2 minut dodaje się 0,55 ml (4,15 mmol) trietyloaminy. Po 10 minutach dodaje się 0,68 g (1,8 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo- N,N,N',N' -tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Warstwę octanową suszy się siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 1:4. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,93 g (76% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{37}H_{48}N_3O_7PS_2$. Masa cząsteczkowa: 741,90 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 18,30 (s, 55%), 18,26 (s, 45%). Widmo 1H NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 0,88–0,92 (m, 6H), 1,37 (s, 9H), 1,65–1,80 (m, 5H), 2,35–2,40 (m, 6H), 3,15–3,17 (m, 2H), 3,50–3,55 (m, 2H), 4,99 (s, 1H), 4,16–4,18 (m, 1H), 5,11–5,13 (m, 1H), 5,16 (s, 1H), 6,79–7,01 (m, 8H). HRMS m/z 764,2569/764.2250 ($M+Na$)⁺.

Etap 7. Usunięcie grupy t-butoksykarbonylowej z tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-feniloetanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymaną w Etapie 6 pochodną tripeptydową estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-feniloetanofosfonowego (1,1 g, 1,48 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,83 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania biotynyłowanej pochodnej tripeptydowej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-feniloetanofosfonowego.

Etap 8. Otrzymywanie biotynyłowanej tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-2-feniloetanofosfonowego.

Powstały w Etapie 7 produkt ($TFA^*Val-Pro-Phe^P(OC_6H_4-4-S-CH_3)_2$) (1,00 g, 1,36 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (N-metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,33 g, 1,36 mmol), a następnie dodaje się diizopropylloaminę (DIEA) w ilości 0,48 ml (3,44 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mieszaniny dodaje się 0,57 g (1,50 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo- N,N,N',N' -tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitril zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,42 g, (36% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{42}H_{54}N_5O_7PS_3$. Masa cząsteczkowa: 868,08 g/mol. Czas retencji

(HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 22,58 min. Analiza HRMS m/z 890,2820/890,2310 ($M+H$)⁺.

Przykład 7

Sposób wytwarzania estru difenyłowego kwasu *N*-(prolilowalilobiotynylo-1-amino)-3-metylo-butanofosfonowego (Bt-Val-Pro-Leu^P(O-C₆H₅)₂, przedstawionego wzorem 7.

Etap 1. Otrzymywanie estru difenyłowego kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszałko magnetyczne zawierającej fosforyn trifenylowy (3,10 g, 10 mmol) dodaje się karbaminian benzylu (1,51 g, 10 mmol) i 1,1 ml (10,5 mmola) aldehydu *iso*-pentyłowego. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 4 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej, a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 2,45 g surowego produktu (54% wagowo). Wzór sumaryczny: C₂₅H₂₈NO₅P. Masa cząsteczkowa: 453,17 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121MHz, roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): δ 19,82 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl₃, ppm): δ 0,91 (d, J=5,6 Hz, 6H), 1,62–1,81 (m, 3H), 4,45–4,58 (m, 1H), 4,93 (d, J=10,4 Hz, 1H), 5,02 (d, J=12,2 Hz, 2H), 5,09 (d, J=12,2 Hz, 2H), 7,01–7,27 (m, 15H).

Etap 2. Otrzymywanie bromowodorku estru difenyłowego kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,00 g estru difenyłowego kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-metylo-butanofosfonowego (4,41 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietyłowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,46 g (83% wagowo) bromowodorku estru difenyłowego kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego. Wzór sumaryczny: C₁₇H₂₃BrNO₃P. Masa cząsteczkowa: 399,06 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 15,61 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 0,90–0,94 (m, 6H), 1,79–1,84 (m, 3H), 4,32–4,35 (m, 1H), 7,37–8,02 (m, 10H), 8,73 (s, 3H).

Etap 3. Otrzymywanie dipeptydowej pochodnej estru difenyłowego kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 0,80 g (2 mmol) bromowodorku estru difenyłowego kwasu 1-amino-2-metylo-butanofosfonowego otrzymanego w Etapie 2 i dodaje się 0,43 g Boc-Pro-OH (2 mmol). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Po 2 minutach dodaje się 0,55 ml trietyloaminy (4 mmol). Po 10 minutach dodaje się 0,76 g (2 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 4:1. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,93 g (90% wagowo). Wzór sumaryczny: C₂₇H₃₇O₆N₂P. Masa cząsteczkowa: 516,24 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121MHz, roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): δ 18,78 (s), 18,79 (s). Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl₃, ppm): δ 0,89 (d, J=3,6 Hz, 6H), 1,36 (s, 9H), 1,36–1,79 (m, 6H), 2,73–2,78 (m, 3H), 3,27–3,33 (m, 1H), 4,24–4,26 (m, 1H), 4,87 (d, J=5,9 Hz, 1H), 6,97–7,28 (m, 10H).

Etap 4. Usunięcie grupy t-Boc z dipeptydowej pochodnej estru difenyłowego kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się pochodną dipeptydową estru difenyłowego kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego (0,83 g, 1,6 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie

i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,81 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania pochodnej tripeptydowej estru difenylowego kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Etap 5. Otrzymywanie tripeptydowej pochodnej estru difenylowego kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do powstałego w Etapie 4 produktu TFA*Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂ (0,81 g; 1,51 mmol) dodaje się 0,33 g (1,51 mmol) Boc-Val-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (10 ml). Po upływie 2 minut dodaje się 0,52 ml (3,76 mmola) trietyloaminy. Po 10 minutach dodaje się 0,63 g (1,66 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Warstwę octanową suszy się siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 1:4. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,86 g (93% wagowo). Wzór sumaryczny: C₃₂H₄₆N₃O₇P. Masa cząsteczkowa: 615,31 g/mol. Widmo ³¹P NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 18,63 (s, 40%), 18,84 (s, 60%). Widmo ¹H NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): 0,83–0,97 (m, 12H), 1,26–1,28 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,80–1,85 (m, 1H), 1,90–2,00 (m, 2H), 2,10–2,20 (m, 2H), 3,69–3,73 (m, 2H), 4,18–4,20 (m, 1H), 4,40–4,56 (m, 1H), 4,85–4,92 (m, 1H), 5,29 (s, 1H), 6,81–7,42 (m, 10H); HRMS *m/z* 638,2971/638,2974 (M+Na)⁺.

Etap 6. Usunięcie grupy t-Boc z tripeptydowej pochodnej estru difenylowego kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymaną w Etapie 5 pochodną tripeptydową estru difenylowego kwasu 1-amino-2-metylo-propanofosfonowego (0,80 g, 1,30 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,79 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania biotynylowanej pochodnej tripeptydowej estru difenylowego kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Etap 7. Otrzymywanie biotynylowanej tripeptydowej pochodnej estru difenylowego kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Powstały w Etapie 6 produkt TFA*Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂ (0,79 g, 1,26 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (*N*-metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,31 g, 1,26 mmol), a następnie dodaje się diizopropylaminę (DIEA) w ilości 0,54 ml (3,15 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mieszaniny dodaje się 0,53 g (1,39 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitril zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,29 g, (29% wagowo). Wzór sumaryczny: C₃₇H₅₂N₅O₇PS. Masa cząsteczkowa: 741,33 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 19,80 min. Analiza HRMS *m/z* 764,3223/764,3000 (M+Na)⁺.

Przykład 8

Sposób wytwarzania estru di-4-metyltiofenylowego kwasu *N*-(prolilbiotynylo-1-amino)-3-metylo-butanofosfonowego (Bt-Pro-Leu^P(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂), przedstawionego wzorem 8.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu tri-4-tiometylofenylowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się 4,2 g (30 mmol) 4-tiometylofenolu i 20 ml acetonitrylu. Po rozpuszczeniu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 0,87 ml (10 mmol) chlorku fosforu (III). Całość ogrzewa się przez sześć godzin w temperaturze wrzenia. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio bez oczyszczania do reakcji syntezy estru di-4-tiometylofenylowego kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-3-metylo-butanofosfonowego.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-3-metylo-butanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforin tri-4-tiometylofenyloвого powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,51 g (10 mmol) karbaminianu benzylu i 1,3 ml (12 mmol) aldehydu iso-pentyloвого. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 3 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 2,35 g surowego produktu (43% wagi). Wzór sumaryczny: $C_{27}H_{32}NO_5PS_2$. Masa cząsteczkowa: 545,65 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 20,37 (s); Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 0,98 (d, $J=5,8$ Hz, 6H), 1,61–2,16 (m, 3H), 2,47 (s, 6H), 4,61–4,63 (m, 1H), 5,06–5,17 (m, 2H), 5,18 (s, 1H), 6,90–7,30 (m, 13H).

Etap 3. Otrzymywanie bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,00 g estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-3-metylo-butanofosfonowego (3,67 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietyloвого do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,63 g (90% wagowo) bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego. Wzór sumaryczny: $C_{19}H_{27}BrNO_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 492,43 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121MHz, roztwór w $DMSO-d_6$, δ [ppm]): δ 15,55 (s); Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $DMSO-d_6$, ppm): δ 0,92–1,11 (m, 6H), 1,15–2,01 (m, 3H), 2,35 (s, 6H), 4,44–4,46 (m, 1H), 6,90–7,36 (m 8H), 8,76 (s, 3H).

Etap 4. Otrzymywanie dipeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 0,98 g (2 mmol) bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego i dodaje się 0,43 g Boc-Pro-OH (2 mmol). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Po 2 minutach dodaje się 0,55 ml trietyloaminy (4 mmol). Po 10 minutach dodaje się 0,76 g (2 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-N,N,N,N'-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 4:1. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 1,12 g (92% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{29}H_{41}O_6N_2PS_2$. Masa cząsteczkowa: 608,75 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 19,00 (s, 43%), 18,83 (s, 57%). Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 0,85–0,87 (m, 6H), 1,37 (s, 9H), 1,65–1,90 (m, 7H), 3,50–3,52 (m, 2H), 3,51 (s, 6H), 4,30–4,35 (m, 1H), 5,20–5,21 (m, 1H), 6,72–7,19 (m, 8H).

Etap 5. Usunięcie grupy t-Boc z pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się pochodną dipeptydową estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego (1,0 g, 1,64 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,99 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania pochodnej tripeptydowej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Etap 6. Otrzymywanie biotynylowanej dipeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Powstały w Etapie 5 produkt TFA* Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂ (0,96 g, 1,33 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (*N*-metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,32 g, 1,33 mmol), a następnie dodaje się diizopropylloaminę (DIEA) w ilości 0,58 ml (3,33 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mieszaniny dodaje się 0,55 g (1,46 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitril zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,21 g, (21% wagowo). Wzór sumaryczny: C₃₄H₄₇N₄O₆PS₃. Masa cząsteczkowa: 734,24 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 21,13 min. Analiza HRMS *m/z* 757,2293–757,2303 (M+Na)⁺.

Przykład 9

Sposób wytwarzania estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu *N*-(prolilowalilobiotynyl-1-amino)-3-metylobutanofosfonowego (Bt-Val-Pro-Leu^P(O-C₆H₄-4-COOCH₃)₂, przedstawionego wzorem 9.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu tri-4-metylokarboksyfenyloвого.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się 4,56 g (30 mmol) 4-metylokarboksyfenolu i 20 ml acetonitrylu. Po rozpuszczeniu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 0,87 ml (10 mmol) chlorku fosforu (III). Całość ogrzewa się przez sześć godzin w temperaturze wrzenia. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio bez oczyszczania do reakcji syntezy estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonylo-1-amino)-3-metylobutanofosfonowego.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonylo-1-amino)-3-metylobutanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn tri-4-metylokarboksyfenyloвого powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,51 g (10 mmol) karbaminianu benzylu i 1,30 ml (12 mmol) aldehydu izowalerianowego (3-metylo-butyloвого). Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 3 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 2,45 g surowego produktu (43% wagowo). Wzór sumaryczny: C₂₉H₃₂NO₉P. Masa cząsteczkowa: 569,54 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121MHz, roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): δ 19,53 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl₃, ppm): δ 0,90 (d, J=5.7 Hz, 6H), 1,79–1,82 (m, 3H), 3,82 (s, 6H), 4,52–4,61 (m, 1H), 5,01–5,16 (m, 3H), 6,92–7,93 (m, 13H). Temperatura topnienia: 87°C.

Etap 3. Otrzymywanie bromowodorku estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,00 g estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonylo-1-amino)-3-metylobutanofosfonowego (3,51 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny.

Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietyloвого do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,60 g (88% wagowo) bromowodorku estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego. Wzór sumaryczny: C₂₁H₂₇BrNO₇P. Masa cząsteczkowa: 516,32 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 16,42 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, ppm): δ 0,91–0,96 (m, 6H), 1,81–1,85 (m, 3H), 3,80 (s, 6H), 4,30–4,33 (m, 1H), 7,36–8,03 (m, 8H), 8,77 (s, 3H).

Etap 4. Otrzymywanie dipeptydowej pochodnej estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 1,03 g (2 mmol) bromowodorku estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego i dodaje się 0,43 g Boc-Pro-OH (2 mmol). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Po 2 minutach dodaje się 0,55 ml trietyloaminy (4 mmol). Po 10 minutach dodaje się 0,76 g (2 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-N,N,N',N'-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 4:1. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,78 g (62% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{31}H_{41}O_{10}N_2P$. Masa cząsteczkowa: 632,64 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 19,62 (s). Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 0,81–0,85 (m, 6H), 1,31 (s, 9H), 1,66–2,21 (m, 7H), 3,26–3,30 (m, 2H), 3,76 (s, 6H), 4,17–4,19 (m, 1H), 4,78–4,80 (m, 1H), 7,27–7,75 (m, 8H).

Etap 5. Usunięcie grupy t-Boc z pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-aminoetanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się pochodną dipeptydową estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego (1,06 g, 1,68 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,86 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania pochodnej tripeptydowej estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego.

Etap 6. Otrzymywanie tripeptydowej pochodnej estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego.

Do powstałego w Etapie 5 produktu $TFA \cdot Pro-Leu^P(OC_6H_4-4-COOCH_3)_2$ (1,05 g; 1,66 mmol) dodaje się 0,37 g (1,66 mmol) Boc-Val-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (10 ml). Po upływie 2 minut dodaje się 0,55 ml (4,15 mmol) trietyloaminy. Po 10 minutach dodaje się 0,68 g (1,8 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-N,N,N',N'-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Warstwę octanową suszy się siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 1:4. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,84 g (69% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{36}H_{50}N_3O_{11}P$. Masa cząsteczkowa: 731,77 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 19,83 (s, 43%), 19,55 (s, 57%). Widmo 1H NMR (roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 0,92–0,95 (m, 12H), 1,36 (s, 9H), 1,60–2,10 (m, 8H), 3,62–3,68 (m, 2H), 3,79 (s, 6H), 4,22–4,25 (m, 1H), 4,44–4,48 (m, 1H), 4,59–5,00 (m, 1H), 5,28 (d, $J=9.3$ Hz), 6,70–7,19 (m, 8H).

Etap 7. Usunięcie grupy t-butoksykarbonylowej z tripeptydowej pochodnej estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymaną w Etapie 6 pochodną tripeptydową estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego (1,05 g, 1,44 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,93 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania biotynylowanej pochodnej tripeptydowej estru di-4-metylokarboksyfenyloвого kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego.

Etap 8. Otrzymywanie biotynylowanej tripeptydowej pochodnej estru di-4-metylokarboksy-fenylowego kwasu 1-amino-3-metylobutanofosfonowego.

Powstały w Etapie 7 produkt (TFA*Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-COOCH₃)₂) (0,99 g, 1,36 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (*N*-metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,33 g, 1,36 mmol), a następnie dodaje się diizopropylaminę (DIEA) w ilości 0,48 ml (3,44 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mieszaniny dodaje się 0,57 g (1,50 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitryl zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,54 g, (46% wagowo). Wzór sumaryczny: C₃₆H₅₀N₅O₇PS₃. Masa cząsteczkowa: 791,98 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna. Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 26,49 min. Analiza HRMS *m/z* 880,3359/880,3408 (M+Na)⁺.

Przykład 10

Sposób wytwarzania estru difenylowego kwasu *N*-(prolilowalilobursztynopentylo-amino-biotynylo-1-amino)-2-fenyletanofosfonowego, (Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(O-C₆H₅)₂), przedstawionego wzorem 10. W celu otrzymania tripeptydowej pochodnej estru difenylowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego wykonuje się Etapy 1–6 opisane w Przykładzie 3.

Etap 7. Otrzymywanie bursztynylowej tripeptydowej pochodnej estru difenylowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego.

Powstały w Etapie 1 produkt (TFA*Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂) (0,88 g, 1,36 mmol) rozpuszcza się w octanie etylu (50 ml) i dodaje bezwodnik bursztynowy (1,5 g, 1,50 mmol). Po 5 minutach do mieszaniny reakcyjnej dodaje się diizopropyletyloaminę w ilości 0,48 ml (3,44 mmol). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej od 12 do 24 godzin a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 100 ml octanu etylu, a następnie przemycza dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcję organiczną suszy się nad bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszającego lotne składniki mieszaniny odparowuje się na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się docelowy produkt w ilości 0,80 g, (91% wagowo). Wzór sumaryczny: C₃₄H₄₀N₃O₈P. Masa cząsteczkowa: 649,67 g/mol. Analiza HRMS *m/z* 672,2451/672,1422 (M+Na)⁺. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 25,71 min. Widmo ³¹P NMR (121MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 18,53 (s, 50%), 17,48 (s, 50%); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 0,86–0,94 (m, 6H), 1,11–1,39 (m, 2H), 1,40–1,45 (m, 1H), 1,51–2,0 (m, 3H), 2,51–2,61 (m, 4H), 2,98–3,06 (m, 1H), 3,38–3,51 (m, 2H), 3,71–3,84 (m, 1H) 4,46–4,50 (m, 1H), 5,13–5,14 (m, 1H), 7,03–7,36 (m, 15H), 7,50 (d, *J*=2,1 Hz, 1H), 7,88 (d, *J*=9,0 Hz, 1H).

Etap 8. Otrzymywanie biotynylowanej bursztynylowej tripeptydowej pochodnej estru difenylowego kwasu 1-amino-2-fenyletanofosfonowego.

Powstały w Etapie 2 produkt (Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂) (88,5 mg, 0,136 mmol) rozpuszcza się w 2 ml NMP (*N*-metylopirolidon) i dodaje biotynylopentyloaminy (Bt-LC-NH₂) (44,5 mg, 0,136 mmol), a następnie dodaje się diizopropylaminę (DIEA) w ilości 48 μl (0,344 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mieszaniny dodaje się 57 mg (0,15 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitryl zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 27,4 mg, (21% wagowo). Wzór sumaryczny: C₄₉H₆₆N₇O₉PS. Masa cząsteczkowa: 960,13 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 19,80 min. Analiza HRMS *m/z* 960,4459/960,4481 (M+H)⁺.

Przykład 11

Sposób wytwarzania estru di-4-tiometylofenylowego kwasu *N*-(treonylowalilofenylalanylobursztynopentyloaminobiotynylo)-1-amino-1-[(4-guanidyno)fenylo]-metanofosfonowego (Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-Gu)Phg^P(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂), przedstawionego wzorem 11.

Etap 1. Otrzymywanie monoestru t-butyłowego kwasu bursztynowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się kolejno bezwodnik bursztynowy (3,00 g, 30 mmol), *N*-hydroksybursztynimid (1,00 g, 9 mmol) oraz dimetylopirydynę (0,35 g, 2,86 mmol) i rozpuszcza

w toluenie (50 ml). Następnie dodaje się alkohol *tert*-butylowy (5 ml) oraz trietyloaminę (1,25 ml, 9 mmol). Całość ogrzewa się w temperaturze wrzenia przez 24 godziny. Po schłodzeniu do mieszaniny poreakcyjnej dodaje się octan etylu (50 ml) i przemywa kolejno 5% kwasem cytrynowym w wodzie, solanką. Frakcję organiczną suszy się nad bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników na wyparce rotacyjnej otrzymuje się brązowy olej, który rozpuszcza się w mieszaninie eteru dietylowego/heksanu (1/3, v/v) i pozostawia do krystalizacji w temperaturze pokojowej. Otrzymuje się produkt w ilości 3,65 g (70% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_8H_{14}O_4$. Masa cząsteczkowa: 174,19 g/mol. Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $DMSO-d_6$, δ [ppm]): δ 1,44 (s, 9H), 2,51–2,68 (m, 4H).

Etap 2. Otrzymywanie peptydu tBu-Suc-Phe-Val-Thr(O-tBu)-OH

Syntezę peptydu *tBu-Suc-Phe-Val-Thr(O-tBu)-OH* przeprowadza się metodą syntezy na podłożu stałym. W tym celu do kartridża reakcyjnego odważa się żywicę chlorotrytylową (1,00 g, 0,92 mmol) zawierającą przyłączoną resztę treoniny, w której reszta hydroksylowa zablokowana jest grupą *tert*-butylową, a grupa aminowa jest wolna. Żywicę przemywa się kolejno dichlorometanem (3 razy), mieszaniną dimetyloformamid:dichlorometan (1/1, v/v; 3 razy) oraz dimetyloformamidem (3 razy). Do przygotowanej żywicy dodaje się Fmoc-Val-OH (0,94 g, 2,76 mmol) i dodaje się dimetyloformamid (2 ml). Po upływie 5 minut do mieszaniny dodaje się PyBOP (1,44 g, 2,76 mmol). Po upływie dwóch minut do mieszaniny reakcyjnej dodaje się diizopropylotetyloaminę (1,2 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez około 2 godziny a jej przebieg monitoruje się przy użyciu testu ninhydrynowego. Następnie całość przemywa się dziesięciokrotnie dimetyloformamidem. Następnie do ziaren żywicy dodaje się 20% roztwór piperydyny w dimetyloformamidzie w celu usunięcia grupy Fmoc i reakcję prowadzi się trzy minuty. Po usunięciu rozpuszczalników ponownie dodaje się świeży roztwór 20% piperydyny w DMF i reakcję prowadzi się trzy minuty. Po usunięciu rozpuszczalników ponownie dodaje się świeży roztwór 20% piperydyny w DMF i reakcję prowadzi się 20 minut. Następnie całość przemywa się dziesięciokrotnie dimetyloformamidem. Do tak przygotowanej żywicy dodaje się Fmoc-Phe-OH (1,07 g, 2,76 mmol) i dodaje się dimetyloformamid (2 ml). Po upływie 5 minut do mieszaniny dodaje się PyBOP (1,44 g, 2,76 mmol). Po upływie dwóch minut do mieszaniny reakcyjnej dodaje się diizopropylotetyloaminę (1,2 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez około 2 godziny a jej przebieg monitoruje się przy użyciu testu ninhydrynowego. Następnie całość przemywa się dziesięciokrotnie dimetyloformamidem. Następnie do ziaren żywicy dodaje się 20% roztwór piperydyny w dimetyloformamidzie w celu usunięcia grupy Fmoc i reakcję prowadzi się trzy minuty. Po usunięciu rozpuszczalników ponownie dodaje się świeży roztwór 20% piperydyny w DMF i reakcję prowadzi się trzy minuty. Po usunięciu rozpuszczalników ponownie dodaje się świeży roztwór 20% piperydyny w DMF i reakcję prowadzi się 20 minut. Następnie całość przemywa się dziesięciokrotnie dimetyloformamidem. Do przygotowanej żywicy dodaje się przygotowany w Etapie 1 monoester *t*-butylowy kwasu bursztynowego (0,48 g, 2,76 mmol) i dodaje się dimetyloformamid (2 ml). Po upływie 5 minut do mieszaniny dodaje się PyBOP (1,44 g, 2,76 mmol). Po upływie dwóch minut do mieszaniny reakcyjnej dodaje się diizopropylotetyloaminę (1,2 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez około 2 godziny a jej przebieg monitoruje się przy użyciu testu ninhydrynowego. Następnie całość przemywa się kolejno: dziesięciokrotnie dimetyloformamidem, 5 razy dichlorometanem, 5 razy metanolem i 5 razy heksanem. Całość suszy się w eksykatorze nad stałym P_2O_5 przez 48 godzin. W celu usunięcia peptydu z nośnika do żywicy dodaje się 30% trifluoroetanolu w dichlorometanie (20 ml) i reakcję prowadzi się 2 godziny w temperaturze pokojowej. Roztwór zawierający produkt przesącza się bezpośrednio z kartridża do kolby okrągłodennej i usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 0,47 g produktu (88% wagowo) w postaci żółto-pomarańczowego oleju. Wzór sumaryczny: $C_{30}H_{47}N_3O_8$. Masa cząsteczkowa: 577,71 g/mol. Analiza HRMS m/z 600,3261/600,2151 ($M+Na$)⁺.

Etap 3. Otrzymywanie fosforynu tri-4-tiometylofenylowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszkło magnetyczne dodaje się 4,2 g (30 mmol) 4-tiometylofenolu i 20 ml acetonitrylu. Po rozpuszczeniu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 0,87 ml (10 mmol) chlorku fosforu (III). Całość ogrzewa się przez sześć godzin w temperaturze wrzenia. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio bez oczyszczania do reakcji syntezy estru di-4-tiometylofenylowego kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-2-metylopropanofosfonowego.

Etap 4. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-1-[(4-nitro)fenylo]-metanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforin tri-4-tiometylofenyloвого powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,51 g (10 mmol) karbaminianu benzylu i 1,51 (10 mmol) *p*-nitrobenzaldehydu. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 3 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 3,90 g surowego produktu (64% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{29}H_{27}N_2O_7PS_2$. Masa cząsteczkowa: 610,64 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 13,66 (s); Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 5,01–5,17 (m, 2H), 5,65 (dd, $J=9,0/23,4$ Hz, 1H), 6,13 (dd, $J=5,7/8,8$ Hz, 1H), 6,91–8,19 (m, 19H). Temperatura topnienia: 160–161°C.

Etap 5. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-1-[(4-amino)fenylo]-metanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymany w Etapie 4 ester di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-1-[(4-nitro)fenylo]-metanofosfonowy w ilości 1,83 g (3 mmol) i rozpuszcza się go w octanie etylu (60 ml). Następnie dodaje się $SnCl_2$ (3,30 g, 17,4 mmol) oraz wodę (1,08 ml, 60 mmol). Całość ogrzewa się w temperaturze wrzenia przez 48 godzin a przebieg reakcji monitoruje się przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 250 ml octanu etylu i roztwór przenosi się do rozdzielacza. Następnie dodaje się wodny roztwór wodorotlenku sodu (1N) aż pH roztworu osiągnie 7–8. Całość sączy się przez warstwę Celitu, oddziela frakcję organiczną i przemywa trzykrotnie solanką. Po wysuszeniu frakcji organicznej nad bezwodnym siarczanem magnezu usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej i otrzymuje produkt w ilości 1,74 g (99% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{29}H_{29}N_5O_5PS_2$. Masa cząsteczkowa: 580,65 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 17,38 (s); Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 4,98 (d, $J=12,5$ Hz, 1H), 5,06 (d, $J=12,4$ Hz, 1H), 5,13 (s, 2H), 5,28 (dd, $J=10,1/20,1$ Hz), 6,47–7,30 (m, 19H), 8,61 (d, $J=10,1,1H$). Temperatura topnienia: 176–178°C.

Etap 6. Otrzymywanie bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-1-[(4-amino)fenylo]-metanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się ester di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-1-[(4-amino)fenylo]-metanofosfonowy w ilości 2,00 g (3,44 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 2,01 g (96% wagowo) bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-1-[(4-amino)fenylo]-metanofosfonowego. Wzór sumaryczny: $C_{21}H_{25}Br_2N_2O_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 608,35 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w $DMSO-d_6$, δ [ppm]): δ 12,68 (s); Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $DMSO-d_6$, ppm): δ 2,43 (d, $J=7,5$ Hz, 6H), 5,45 (d, $J=12,5$ Hz), 6,81–7,43 (m, 12H), 9,21 (s, 4H).

Etap 7. Otrzymywanie N,N'-di-Boc-S-etyloizotiomocznika.

Do kolby okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne odważa się tiomocznik (7,62 g, 0.1 mola) i zalewa absolutnym alkoholem etylowym. Następnie do roztworu dodaje się świeżo destylowany bromoetan (8,3 ml, 0,11 mola) i całość ogrzewa w temperaturze wrzenia. Reakcję prowadzi się przez 4 godziny po czym lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej odparowuje na wyparce rotacyjnej. Otrzymany olej zalewa się eterem dietylowym (100 ml) i pozostawia do krystalizacji w temperaturze pokojowej. Powstały biały krystaliczny osad odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywa eterem dietylowym i suszy w eksykatorze nad P_2O_5 . Wysuszony bromowodorek S-etyloizotiomocznika odważa się następnie do kolby okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne i wkrapla (1,85 g, 0,01 mola) i rozpuszcza w absolutnym dichlorometanie (25 ml). Następnie dodaje się diwęglan di-*tert*-butylu (0,48 g, 0,022 mola) i po rozpuszczeniu do mieszaniny reakcyjnej wkrapla powoli diizopropyluetyloaminę (3,6 ml, 0,022 mola). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 4–5 dni a jej przebieg monitoruje metodą chromatografii cienkowarstwowej. Mieszaninę poreakcyjną

przenosi się do rozdzielacza i przemywa kolejno solanką, 5% NaHCO₃, 5% kwasem cytrynowym i wodą. Warstwę organiczną suszy się nad bezwodnym siarczanem magnezu i po odsączeniu środka suszącego pozostawia na powietrzu w celu krystalizacji. Produkt krystalizuje w postaci długich, prostopadłościennych, bezbarwnych kryształów, które odsąca się pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywa heksanem i suszy na powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się produkt w ilości 2,55 g (84% wagowo). Wzór sumaryczny: C₁₃H₂₄N₂O₄S. Masa cząsteczkowa: 304,41 g/mol. Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl₃, ppm): δ 1,24 (t, J=4,2 Hz, 3H), 1,48 (d, J=4.1, 18H), 3,01 (q, J=7,5 Hz, 2H), 11,62 (s, 1H). Temperatura topnienia: 69°C.

Etap 8. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(treonylowalilofenyloalanylobursztynilo-t-butylo)-1-amino-1-[(4-amino)fenylo]-metanofosfonowego (tBu-Suc-Phe-Val-Thr-(4-NH₂)Phg^P-(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymany w Etapie 2 peptyd t-Bu-Suc-Phe-Val-Thr(O-tBu)-OH (240 mg, 0,41 mmol) i rozpuszcza w acetonitrylu (10 ml). Następnie dodaje się otrzymany w Etapie 6 bromowoderek estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-1-[(4-amino)fenylo]-metanofosfonowego (255 mg, 0,41 mmol). Mieszaninę schładza się w łaźni lodowej i po 2 minutach dodaje się 0,21 ml trietyloaminy (1,48 mmol). Po 10 minutach dodaje się 190 mg (0,49 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-N,N,N',N'-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się przez 24 godziny do samoistnego ogrzania do temperatury pokojowej. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Z mieszaniny poreakcyjnej usuwa się lotne składniki na wyparce rotacyjnej, pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu (50 ml), przenosi do rozdzielacza i przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a otrzymany surowy produkt w ilości 360 mg wykorzystuje się bezpośrednio do reakcji otrzymywania estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(treonylowalilofenyloalanylobursztynilo-t-butylo)-1-amino-1-[(4-di-Boc-guanidyno)fenylo]-metanofosfonowego. Wzór sumaryczny: C₅₁H₆₈O₁₀N₅PS₂. Masa cząsteczkowa: 1006,22 g/mol. Analiza HRMS m/z 1028,4043/1028,1646 (M+Na)⁺.

Etap 9. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(treonylowalilofenyloalanylobursztynilo-t-butylo)-1-amino-1-[(4-di-Boc-guanidyno)fenylo]-metanofosfonowego (tBu-Suc-Phe-Val-Thr-(4-Boc₂Gu)Phg^P(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymany w Etapie 7 ester di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(treonylowalilofenyloalanylobursztynilo-t-butylo)-1-amino-1-[(4-amino)fenylo]-metanofosfonowego w ilości 340 mg (0,33 mmol) i rozpuszcza się w absolutnym chloroformie (30 ml). Następnie dodaje się otrzymany w Etapie 6 N,N'-di-Boc-S-etyloizotiomocznik (155 mg, 0,49 mmol), trietyloaminę (0,14 ml, 1 mmol) oraz HgCl₂ (850 mg, 3,9 mmol). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Mieszaninę poreakcyjną sączy się przez warstwę Celitu, lotne składniki usuwa się na wyparce rotacyjnej, pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu (50 ml), przenosi do rozdzielacza i przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a otrzymany surowy produkt w ilości 320 mg wykorzystuje się bezpośrednio do reakcji otrzymywania estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(treonylowalilofenyloalanylobursztynilo)-1-amino-1-[(4-guanidyno)fenylo]-metanofosfonowego. Wzór sumaryczny: C₆₂H₈₆O₁₄N₇PS₂. Masa cząsteczkowa: 1248,49 g/mol. Analiza HRMS m/z 1270,5310/1270,3177 (M+Na)⁺.

Etap 10. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(treonylowalilofenyloalanylobursztynilo)-1-amino-1-[(4-guanidyno)fenylo]-metanofosfonowego (Suc-Phe-Val-Thr-(4-Gu)Phg^P(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymany w Etapie 8 ester di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(treonylowalilofenyloalanylobursztynilo-t-butylo)-1-amino-1-[(4-di-Boc-guanidyno)fenylo]-metanofosfonowego w ilości 320 mg i rozpuszcza się w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (5 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Następnie produkt izoluje się przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitryl zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-8. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 42 mg, (18% wagowo). Wzór sumaryczny: C₄₄H₅₄N₇O₁₀PS₂. Masa czą-

steczkowa: 936,04 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna SunFire™ Prep, 10x250 mm, 5 μm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 23,41 min. Analiza HRMS m/z 936,3190/936,0670 (M+H)⁺.

Etap 11. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(treonylowalilofenyloalanylobursztynylopyntyloaminobiotynylo)-1-amino-1-[(4-guanidyno)fenylo]-metanofosfonowego (Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-Gu)Phgp (O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂).

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymany w Etapie 9 ester di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(treonylowalilofenyloalanylobursztynylo)-1-amino-1-[(4-guanidyno)fenylo]-metanofosfonowego (Suc-Phe-Val-Thr-(4-Gu)Phg^P(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂ w ilości 10 mg (0,01 mmol) i rozpuszcza w 0,5 ml NMP NMP (N-metylopirolidon) i dodaje biotynylopyntyloaminy (Bt-LC-NH₂ (3,5 mg, 0,01 mmol), a następnie dodaje się diizopropylloaminę (DIEA) w ilości 6 μl (0,03 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników do mieszaniny dodaje się 4,6 mg (0,012 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-N,N,N',N'-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitril zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 6,8 mg, (54% wagowo). Wzór sumaryczny: C₅₉H₈₀N₁₁O₁₁PS₃. Masa cząsteczkowa: 1246,50 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 23,97 min. Analiza HRMS m/z 1246,5017/1246,4969 (M+H)⁺.

Przykład 12

Sposób wytwarzania estru di-4-metyltiofenyloвого kwasu N-(prolilowalilobiotynylo-1-amino)-3-metylo-butanofosfonowego (Bt-Val-Pro-Leu^P(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂, przedstawionego wzorem 12.

Etapy od 1 do 5 opisano w przykładzie 8.

Etap 6. Otrzymywanie tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do powstałego w Etapie 5 (Przykład 8) produktu TFA*Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂ (m=0,99 g; 1,59 mmol) dodaje się 0,35 g (1,59 mmol) Boc-Val-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (10 ml). Po upływie 2 minut dodaje się 0,53 ml (3,98 mmola) trietyloaminy. Po 10 minutach dodaje się 0,64 g (1,7 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo-N,N,N',N'-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Warstwę octanową suszy się siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 1:4. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 1,02 g (91% wagowo). Wzór sumaryczny: C₃₄H₅₀N₃O₇PS₂. Masa cząsteczkowa: 707,88 g/mol. Widmo ³¹P NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): δ 18,32 (s, 60%), 19,40 (s, 60%). Widmo ¹H NMR (roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): δ 0,94–1,02 (m, 12H), 1,36 (s, 1H), 1,50 (s, 9H), 1,60–1,92 (m, 7H), 2,35–2,38 (m, 6H), 3,50–3,55 (m, 2H), 4,50–4,52 (m, 1H), 4,80–4,90 (m, 1H), 5,10 (s, 1H), 6,20–7,50 (m, 8H). HRMS m/z 730,2725/730,2731.

Etap 7. Usunięcie grupy t-butyloksykarbonylowej z tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymaną w Etapie 6 pochodną tripeptydową estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego (1,0 g, 1,41 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,96 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania biotynylowanej pochodnej tripeptydowej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Etap 8. Otrzymywanie biotynylowanej tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-3-metylo-butanofosfonowego.

Powstały w Etapie 7 produkt TFA*Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂ (0,96 g, 1,33 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (N-metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,32 g, 1,33 mmol), a następnie dodaje się diizopropylloaminę (DIEA) w ilości 0,58 ml (3,33 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników

do mieszaniny dodaje się 0,55 g (1,46 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitryl zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,49 g, (44% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{39}H_{56}N_5O_7PS_3$. Masa cząsteczkowa: 833,31 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%-95% MeCN/45min): 22,46 min. Analiza HRMS m/z 834,3158/834,2836 ($M+H$)⁺.

Przykład 13

Sposób wytwarzania estru di-4-metyltiofenyloвого kwasu *N*-(prolilowalilobiotynylo-1-amino)-propanofosfonowego (Bt-Val-Pro-Abu^P(O-C₆H₄-4-S-CH₃)₂, przedstawionego wzorem 13.

Etap 1. Otrzymywanie fosforynu tri-4-tiometylofenylowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło magnetyczne dodaje się 4,2 g (30 mmol) 4-tiometylofenolu i 20 ml acetonitrylu. Po rozpuszczeniu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 0,87 ml (10 mmol) chlorku fosforu (III). Całość ogrzewa się przez sześć godzin w temperaturze wrzenia. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce obrotowej. Powstały surowy produkt w postaci oleju wykorzystuje się bezpośrednio bez oczyszczania do reakcji syntezy estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-propanofosfonowego.

Etap 2. Otrzymywanie estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu N-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-butanofosfonowego.

W tym celu do kolby okrągłodennej – zawierającej fosforyn tri-4-tiometylofenylovery powstały bezpośrednio w etapie 1 – wyposażonej w mieszadło magnetyczne odważa się 1,51 g (10 mmol) karbaminianu benzylu i 0,86 ml (12 mmol) aldehydu propionowego. Po rozpuszczeniu wszystkich składników w 10 ml lodowatego kwasu octowego całość ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90°C przez 3 godziny. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwa się lotne składniki mieszaniny na wyparce rotacyjnej a pozostałość rozpuszcza w 100–150 ml metanolu i umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu. Uzyskany produkt odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 3,99 g surowego produktu (77% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{25}H_{28}NO_5PS_2$. Masa cząsteczkowa: 517,11 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121 MHz, roztwór w CDCl₃, δ [ppm]): δ 18,79 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w CDCl₃, ppm): δ 1,06–1,11 (t, *J*=14,7 Hz, 3H), 1,72–1,80 (dd, *J*=15,2/7,5 Hz, 1H), 2,06–2,11 (m, 2H), 2,44 (s, 6H), 4,35–4,43 (m, 1H), 5,08–5,18 (d, *J*=6,6 Hz, 2H), 7,00–7,33 (m, 13H). Współczynnik *R*_f = 0,60 (CHCl₃:AcOEt, 4:1, v/v). Temperatura topnienia: 107°C.

Etap 3. Otrzymywanie bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 2,00 g estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu *N*-(benzyloksykarbonyl-1-amino)-butanofosfonowego (3,87 mmol) i dodaje się 5,00 ml roztworu kwasu bromowodorowego (33%) w kwasie octowym. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, a uzyskany olej rozpuszcza się w minimalnej ilości metanolu i dodaje się eteru dietylowego do pierwszego zmętnienia. Kolbę umieszcza się w temperaturze -20°C na 24 godziny w celu krystalizacji produktu, który odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i suszy na wolnym powietrzu do stałej wagi. Otrzymuje się 1,67 g (93% wagowo) bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego. Wzór sumaryczny: $C_{17}H_{23}BrNO_3PS_2$. Masa cząsteczkowa: 463,00 g/mol. Widmo ³¹P NMR (121 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, δ [ppm]): δ 13,03 (s); Widmo ¹H NMR (300 MHz, roztwór w DMSO-*d*₆, ppm): δ 1,17–1,22 (t, *J*=6,3 Hz, 3H), 2,08–2,20 (m, 2H), 2,37 (s, 6H), 3,95–4,02 (m, 1H), 7,00–7,23 (m, 8H), 8,92–9,09 (d, *J*=6,9 Hz, 3H). Temperatura topnienia: 148°C. Współczynnik *R*_f = 0,21 (CHCl₃:AcOEt, 4:1, v/v).

Etap 4. Otrzymywanie dipeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się 0,93 g (2 mmol) bromowodoru estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego i dodaje się 0,43 g Boc-Pro-OH (2 mmol). Całość zalewa się acetonitrylem (15 ml). Po 2 minutach dodaje się 0,55 ml trietyloaminy (4 mmol). Po 10 minutach dodaje się 0,76 g (2 mmol) heksafluorofosforanu *O*-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego.

Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Frakcje octanowe suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Po usunięciu środka suszącego odparowuje się lotne składniki, a następnie produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 4:1. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 1,01 g (87% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{27}H_{37}O_6N_2PS_2$. Masa cząsteczkowa: 580,18 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 18,95 (s); Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 0,96–1,08 (m, 2H), 1,22–1,27 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,60–2,40 (m, 5H), 2,44 (s, 6H). Temperatura topnienia: 54°C. Współczynnik $R_f = 0,28$ ($CHCl_3$:AcOEt, 4:1, v/v).

Etap 5. Usunięcie grupy t-Boc z pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się pochodną dipeptydową estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego (1,0 g, 1,72 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,96 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania pochodnej tripeptydowej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego.

Etap 6. Otrzymywanie tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego.

Do powstałego w Etapie 5 produktu $TFA \cdot Pro \cdot Abu^P(OC_6H_4-4-S-CH_3)_2$ ($m = 0,96$ g; 1,62 mmol) dodaje się 0,36 g (1,62 mmol) Boc-Val-OH. Całość zalewa się acetonitrylem (10 ml). Po upływie 2 minut dodaje się 0,54 ml (4,05 mmol) trietyloaminy. Po 10 minutach dodaje się 0,68 g (1,8 mmol) heksafluorofosforanu O-benzotriazol-1-ylo- N,N,N',N' -tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną zalewa się solanką, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu. Warstwę octanową przemywa się kolejno: dwukrotnie wodorosiarczanem potasu (5%), solanką, dwukrotnie wodorowęglanem sodu (5%), solanką. Warstwę octanową suszy się siarczanem magnezu. Po usunięciu lotnych składników produkt oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej stosując, jako eluent chloroform/octan etylu w stosunku objętościowym 1:4. Po zebraniu frakcji zawierających produkt lotne rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej. Otrzymuje się oczekiwany produkt o masie 0,97 g (88% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{32}H_{46}N_3O_7PS_2$. Masa cząsteczkowa: 679,25 g/mol. Widmo ^{31}P NMR (121 MHz, roztwór w $CDCl_3$, δ [ppm]): δ 18,66 (s, 59%), 19,06 (s, 41%). Widmo 1H NMR (300 MHz, roztwór w $CDCl_3$, ppm): δ 0,85–1,05 (m, 10H), 1,43 (s, 9H), 1,60–2,18 (m, 7H), 2,45 (s, 6H), 3,52–3,80 (m, 2H), 4,25–4,30 (m, 1H), 4,50–4,52 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H), 4,55–4,75 (m, 1H), 5,16–5,30 (dd, $J = 9,0/33,0$ Hz, 1H), 7,03–7,22 (m, 8H). Temperatura topnienia: 53°C. Współczynnik $R_f = 0,10$ ($CHCl_3$:AcOEt, 4:1, v/v).

Etap 7. Usunięcie grupy t-butyloksykarbonylowej z tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego.

Do kolby okrągłodennej odważa się otrzymaną w Etapie 6 pochodną tripeptydową estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego (0,95 g, 1,40 mmol) i rozpuszcza się ją w 50% roztworze kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (10 ml). Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a jej przebieg monitoruje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie lotne składniki mieszaniny poreakcyjnej usuwa się na wyparce obrotowej, uzyskany olej rozpuszcza się w toluenie i ponownie odparowuje. Czynność tą powtarza się trzykrotnie. Powstały produkt w postaci oleju o masie 0,93 g wykorzystuje się bez oczyszczania do otrzymania biotynylowanej pochodnej tripeptydowej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego.

Etap 8. Otrzymywanie biotynylowanej tripeptydowej pochodnej estru di-4-tiometylofenyloвого kwasu 1-amino-butanofosfonowego.

Powstały w Etapie 7 produkt $TFA \cdot Val \cdot Pro \cdot Abu^P(OC_6H_4-4-S-CH_3)_2$ (0,93 g, 1,34 mmol) rozpuszcza się w 10 ml NMP (N -metylopirolidon) i dodaje biotynę (0,33 g, 1,34 mmol), a następnie dodaje się diizopropylaminę (DIEA) w ilości 0,58 ml (3,35 mmol). Po rozpuszczeniu wszystkich składników

do mieszaniny dodaje się 0,56 g (1,47 mmol) heksafluorofosforanu (*O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie produkt izoluje się bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu chromatografii HPLC w układzie rozpuszczalników woda-acetonitryl zawierających 0,05% kwasu trifluorooctowego stosując kolumnę C-18. Frakcje zawierające produkt poddaje się liofilizacji i uzyskuje oczekiwany produkt w ilości 0,61 g, (57% wagowo). Wzór sumaryczny: $C_{37}H_{52}N_5O_7PS_3$. Masa cząsteczkowa: 805,28 g/mol. Czas retencji (HPLC, kolumna Alltech Econosphere C-18 10U, 250x22 mm, gradient 5%–95% MeCN/45min): 20,55 min. Analiza HRMS m/z 828,2664/828,2648 ($M+Na$)⁺.

Przykład 14

Aktywność inhibitorowa pochodnych otrzymanych w przykładach 1–13 wobec wybranych proteaz serynowych i cysteinowych.

Aktywność biologiczną otrzymanych peptydowych pochodnych estrów diarylowych fosfonowych analogów waliny, alaniny, fenyloalaniny, 4-guanidynofenyloglicyny, leucyny i kwasu 1-amino-masłowego zawierających na *N*-końcu resztę biotyny przebadano pod kątem zdolności do hamowania proteolitycznej aktywności wybranych proteaz serynowych, a także kontrolnych proteaz cysteinowych. Wszystkie badania wykonano przy zastosowaniu czytnika mikropłytek Molecular Devices Spectramax Gemini XP. Jako substratów reakcji enzymatycznych użyto fluorescencyjnych substratów peptydowych. Sposób wykonania pomiaru aktywności otrzymanych związków opisano poniżej dla każdego z testowanych enzymów: ludzkiej neutrofilowej elastazy (HNE), świńskiej elastazy trzustkowej (PPE), subtilizyny (Sub), katepsyny G (CatG), proteinazy 3 (PR3), chymotrypsyny (ChTry), trypsyny (Try), papainy (Pap) oraz katepsyny L (CatL). Pomiar aktywności inhibitorowej wykonano przy różnych stężeniach inhibitorów w zakresie od 12,5 nM do 2000 nM.

Pomiar aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec ludzkiej neutrofilowej elastazy (HNE).

Pomiar aktywności wykonuje się w temperaturze 37°C w buforze 0,01 M HEPES, 0,5 M NaCl, 0,03% Triton X-100, pH 7,5, w czasie 10 minut po uprzedniej preinkubacji roztworu enzymu i inhibitora w 37°C w czasie 10 minut. Stężenie enzymu wynosi 0,0025 U/ml. Substrat Me-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AFC o stężeniu 25 μM. Pomiaru dokonuje się przy długości fali wzbudzenia 400 nm i emisji 505 nm.

Pomiar aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec świńskiej trzustkowej elastazy (PPE).

Pomiar aktywności wykonuje się w temperaturze 37°C w buforze 0,01 M Tris-HCl, 0,05% Triton X-100, pH 8,5, w czasie 10 minut po uprzedniej pre-inkubacji roztworu enzymu i inhibitora w 37°C w czasie 10 minut. Stężenie enzymu wynosi 60 nM. Substrat Me-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC o stężeniu 100 μM. Pomiaru dokonuje się przy długości fali wzbudzenia 350 nm i emisji 460 nm.

Pomiar aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec subtilizyny (Sub).

Pomiar aktywności wykonuje się w temperaturze 37°C w buforze 0,05 M Tris-HCl, 1M NaCl, 0,01% Triton X-100, pH 7,5, w czasie 10 minut po uprzedniej pre-inkubacji roztworu enzymu i inhibitora w 37°C w czasie 10 minut. Stężenie enzymu wynosi 5nM. Substrat Me-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC o stężeniu 5 μM. Pomiaru dokonuje się przy długości fali wzbudzenia 350 nm i emisji 460 nm.

Pomiar aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec trypsyny (Try).

Pomiar aktywności wykonuje się w temperaturze 37°C w buforze 0,1 M HEPES, 0,5M NaCl, 0,03% Triton X-100, pH 7,5, w czasie 10 minut po uprzedniej pre-inkubacji roztworu enzymu i inhibitora w 37°C w czasie 10 minut. Stężenie enzymu wynosi 25 nM. Substrat Cbz-Arg-AFC o stężeniu 100 μM. Pomiaru dokonuje się przy długości fali wzbudzenia 400 nm i emisji 505 nm.

Pomiar aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec chymotrypsyny (ChTry).

Pomiar aktywności wykonuje się w temperaturze 37°C w buforze 0,1 M HEPES, 0,5M NaCl, pH 7,5, w czasie 10 minut po uprzedniej pre-inkubacji roztworu enzymu i inhibitora w 37°C w czasie 10 minut. Stężenie enzymu wynosi 3 nM. Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC o stężeniu 5 μM. Pomiaru dokonuje się przy długości fali wzbudzenia 350 nm i emisji 460 nm.

Pomiar aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec katepsyny G (CatG).

Pomiar aktywności wykonuje się w temperaturze 37°C w buforze 0,1 M Tris-HCl, 0,5M NaCl, pH 7,5, w czasie 10 minut po uprzedniej pre-inkubacji roztworu enzymu i inhibitora w 37°C w czasie 10 minut. Stężenie enzymu wynosi 100 nM. Substrat MCA-Phe-Val-Thr-Gnf-Ser-Trp-Anb-NH₂ o stężeniu 2,5 μM. Pomiaru dokonuje się przy długości fali wzbudzenia 325 nm i emisji 400 nm.

Pomiar aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec proteiny 3 (PR3).

Pomiar aktywności wykonuje się w temperaturze 37°C w buforze 0,1 M Tris-HCl, 0,5M NaCl, pH 7,5, w czasie 10 minut po uprzedniej pre-inkubacji roztworu enzymu i inhibitora w 37°C w czasie 10 minut. Stężenie enzymu wynosi 17 nM. Substrat Abz-Tyr-Tyr-Abu-Anb-NH₂ o stężeniu 30 μM. Pomiaru dokonuje się przy długości fali wzbudzenia 325 nm i emisji 400 nm.

Pomiar aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec katepsyny L (CatL).

Pomiar aktywności wykonuje się w temperaturze 37°C w buforze 0,4 M octan sodu, 4 mM EDTA, 8mM DTT, pH 5,5, w czasie 10 minut po uprzedniej pre-inkubacji roztworu enzymu i inhibitora w 37°C w czasie 10 minut. Stężenie enzymu wynosi 2 ng/ml. Substrat Cbz-Phe-Arg-AMC o stężeniu 7 μM. Pomiaru dokonuje się przy długości fali wzbudzenia 350 nm i emisji 460 nm.

Pomiar aktywności inhibitorowej otrzymanych związków wobec papainy (Pap).

Pomiar aktywności wykonuje się w temperaturze 37°C w buforze 0,4 M octan sodu, 4 mM EDTA, 8 mM DTT, pH 5,5, w czasie 10 minut po uprzedniej pre-inkubacji roztworu enzymu i inhibitora w 37°C w czasie 10 minut. Stężenie enzymu wynosi 25 nM. Substrat Cbz-Phe-Arg-AMC o stężeniu 4,5 μM. Pomiaru dokonuje się przy długości fali wzbudzenia 350 nm i emisji 460 nm.

Wyniki przedstawiono w Tabeli 1. Wartość IC₅₀ – stężenie inhibitora potrzebne do zahamowania połowy aktywności enzymu po 10 min inkubacji.

Tabela 1

Wyniki badania aktywności inhibitorowej peptydowych pochodnych estrów diarylowych fosfonowych analogów waliny, alaniny, fenyloalaniny, 4-guanidynofenyloglicyny, leucyny i kwasu 1-aminomasłowego zawierających na N-końcu resztę biotyny wobec ludzkiej neutrofilowej elastazy (HNE), świńskiej elastazy trzustkowej (PPE), subtilyzyny (Sub), katepsyny G (CatG), proteiny 3 (PR3), chymotrypsyny (ChTry), trypsyny (Try), papainy (Pap) oraz katepsyny L (CatL).

	HNE		PPE		PR3		Cat G	
	IC ₅₀ [nM]	K _{obs} /[I] [M ⁻¹ s ⁻¹]	IC ₅₀ [nM]	K _{obs} /[I] [M ⁻¹ s ⁻¹]	IC ₅₀ [nM]	K _{obs} /[I] [M ⁻¹ s ⁻¹]	IC ₅₀ [nM]	K _{obs} /[I] [M ⁻¹ s ⁻¹]
1	2.1±0.1	5.5*10 ⁵	23.5±4.5	4.9*10 ⁴	72.5±6	3.2*10 ⁴	NI	NI
2	6.5±0.3	1.8*10 ⁵	245.5±30.5	4.7*10 ³	728±44	3.2*10 ³	NI	NI
3	NI	NI	NI	NI	NI	NI	258±33	4.5*10 ³
4	5.55±0.25	2.1*10 ⁵	135.5±7.5	8.5*10 ³	NI	NI	NI	NI
5	NI	NI	5000	2*10 ²	NI	NI	NI	NI
6	1.55±0.05	2.5*10 ⁵	NI	NI	NI	NI	218±45	5.3*10 ³
7	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
8	3797±250	3.0*10 ²	NI	NI	NI	NI	1095±139	1.0*10 ³
9	5.61±0.02	2.1*10 ⁵	>5000	<200	59.5±8	3.9*10 ⁴	720±60	1.6*10 ³
10	NI	NI	NI	NI	NI	NI	300±0.5	3.8*10 ³
11	NI	NI	NI	NI	603±49	3.8*10 ³	4741±556	2.4*10 ²
12	66.5±6.5	1.7*10 ⁴	288.8±10	4*10 ³	NI	NI	436±22	2.6*10 ³
13	2.75±0.05	4.2*10 ⁵	23.5±1.95	4.9*10 ⁴	227±17	1.0*10 ⁴	NI	NI

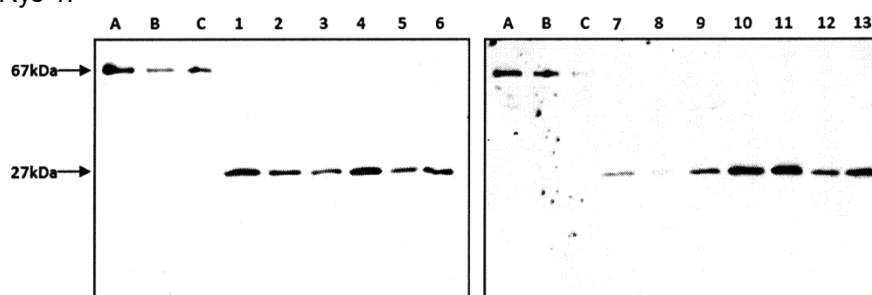
	ChyTr		Sub		Try		Cat L		Pap	
	IC ₅₀ [nM]	K _{obs} /[I] [M ⁻¹ s ⁻¹]	IC ₅₀ [nM]	K _{obs} /[I] [M ⁻¹ s ⁻¹]	IC ₅₀ [nM]	K _{obs} /[I] [M ⁻¹ s ⁻¹]	IC ₅₀ [nM]	K _{obs} /[I] [M ⁻¹ s ⁻¹]	IC ₅₀ [nM]	K _{obs} /[I] [M ⁻¹ s ⁻¹]
1	182.5±3.5	6.3*10 ³	77.5±4.5	1.5*10 ⁴	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2	NI	NI	415±17	2.8*10 ³	NI	NI	NI	NI	NI	NI
3	20.65±0.25	5.6*10 ⁴	11.6±0.2	1.0*10 ⁵	NI	NI	NI	NI	NI	NI
4	NI	NI	40.2±0.01	2.9*10 ⁴	NI	NI	NI	NI	NI	NI
5	156±12	7.4*10 ³	47.9±0.57	2.4*10 ⁴	NI	NI	NI	NI	NI	NI
6	11.5±2.5	1.0*10 ⁵	5.6±0.8	2.1*10 ⁵	3150±550	3.7*10 ²	NI	NI	NI	NI
7	123.3±4.4	9.4*10 ³	76.5±1.65	1.5*10 ⁴	NI	NI	NI	NI	NI	NI
8	400±30	2.9*10 ³	11.7±0.61	9.9*10 ⁴	1150±140	1*10 ³	NI	NI	NI	NI
9	22±4	5.2*10 ⁴	21.2±1.2	5.4*10 ⁴	26.25±0.45	4.4*10 ⁴	NI	NI	NI	NI
10	16.4±1.2	7.0*10 ⁴	39.95±4.6	2.9*10 ⁴	NI	NI	NI	NI	NI	NI
11	NI	NI	480.5±15.5	2.4*10 ³	424.5±9.5	2.7*10 ³	NI	NI	NI	NI
12	25.7±5	4.5*10 ⁴	NI	NI	612±90	1.9*10 ³	NI	NI	NI	NI
13	970±80	1.2*10 ³	147±4	7.8*10 ³	3900±200	3*10 ²	NI	NI	NI	NI

NI – brak inhibicji

Przykład 15

Detekcja aktywnej enzymatycznie subtylizyny w płynie hodowlanym bakterii *Bacillus subtilis*.

Z 48 godzinnej hodowli bakterii *Bacillus subtilis* pobrano 10 ml roztworu i przefiltrowano przy użyciu filtra strzykawkowego ($0,22\ \mu\text{m}$) w celu usunięcia komórek bakteryjnych. Do otrzymanego płynu hodowlanego ($50\ \mu\text{l}$) dodano po $1\ \mu\text{l}$ roztworu badanego związku (do każdej probówki inny związek) o stężeniu $1\ \text{mM}$ sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO). Roztwory inkubowano następnie w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Do każdego z roztworów dodano następnie bufor redukujący do nakładania próbek do rozdziału elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po $10\ \mu\text{l}$ z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdziału elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0,05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rys 1.



Rys. 1. Wyniki analizy western blotting płynu hodowlanego *Bacillus subtilis* po inkubacji z otrzymanymi związkami. Oznaczenia: A, B, C – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 2,4 (A), 1,2 (B) i 0,6 (C) pmoli biotyny/studzienkę. Numery 1–13 odpowiadają otrzymanym związkom: 1 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 1], 2 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 2], 3 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 3], 4 [Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 4], 5 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-O-CH₃)₂; Przykład 5], 6 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 6], 7 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 7], 8 [Bt-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 8], 9 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-COOCH₃)₂; Przykład 9], 10 [Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 10], 11 [Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 11], 12 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 12], 13 [Bt-Val-Pro-Abu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 13].

Przykład 16

Detekcja aktywnej enzymatycznie formy subtylizyny

Przygotowano wodny roztwór subtylizyny (Sigma-Aldrich z *Bacillus licheniformis*, nr. 85968) o stężeniu $0,8187\ \text{mg/ml}$. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem fosforanowym ($100\ \text{mM}$ fosforan sodu, $150\ \text{mM}$ chlorek sodu, pH 7,2) tak, że końcowe stężenie enzymu wynosiło $62,5\ \mu\text{g/ml}$. Z otrzymanego roztworu pobrano po $20\ \mu\text{l}$ i przeniesiono do osobnych probówek. Do każdej z probówek dodano po $1\ \mu\text{l}$ roztworu badanego związku (do każdej probówki inny związek) o stężeniu $1\ \text{mM}$ sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO). Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C do każdego dodano następnie bufor redukujący do nakładania próbek do rozdziału elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po $10\ \mu\text{l}$ z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdziału elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0,05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rys 2.

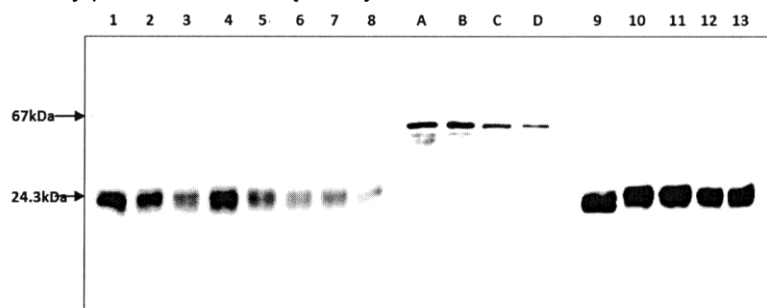


Rys 2. Wyniki analizy western blotting sutylizyny pochodzącej z *Bacillus licheniformis* po inkubacji z otrzymanymi związkami. Oznaczenia: A, B, C, D – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 4,8 (A), 2,4 (B), 1,2 (C) i 0,6 (D) pmoli biotyny/studzienkę. Numery 1–13 odpowiadają otrzymanym związkom: 1 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 1], 2 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 2], 3 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 3], 4 [Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 4], 5 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-O-CH₃)₂; Przykład 5], 6 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 6], 7 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 7], 8 [Bt-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 8], 9 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-COOCH₃)₂; Przykład 9], 10 [Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 10], 11 [Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 11], 12 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 12], 13 [Bt-Val-Pro-Abu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 13].

Przykład 17

Detekcja aktywnej enzymatycznie formy katepsyny G

Przygotowano roztwór katepsyny G (Biocentrum, nr. E-002) o stężeniu 1,176 mg/ml. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem fosforanowym (100 mM fosforan sodu, 150 mM chlorek sodu, pH 7,2) tak, że końcowe stężenie enzymu wynosiło 62,5 µg/ml. Z otrzymanego roztworu pobrano po 20 µl i przeniesiono do osobnych probówek. Do każdej z probówek dodano po 1 µl roztworu badanego zawiązku (do każdej probówki inny związek) o stężeniu 1 mM sporządzonego w dimetylo-sulfotlenku (DMSO). Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C do każdego roztworu dodano następnie bufor redukujący do nakładania próbek do rozdzielu elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po 8 µl z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0.05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rys 3.

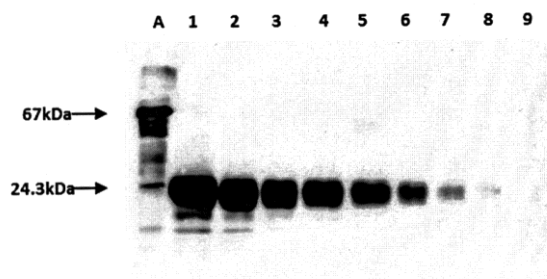


Rys 3. Wyniki analizy western blotting ludzkiej katepsyny G po inkubacji z otrzymanymi związkami. Oznaczenia: A, B, C, D – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 4,8 (A), 2,4 (B), 1,2 (C) i 0,6 (D) pmoli biotyny/studzienkę. Numery 1–13 odpowiadają otrzymanym związkom: 1 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 1], 2 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 2], 3 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 3], 4 [Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 4], 5 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-O-CH₃)₂; Przykład 5], 6 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 6], 7 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 7], 8 [Bt-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 8], 9 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-COOCH₃)₂; Przykład 9], 10 [Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 10], 11 [Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 11], 12 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 12], 13 [Bt-Val-Pro-Abu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 13].

Przykład 18

Określenie limitu detekcji aktywnej katepsyny G przez związek 4 [Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂]

Przygotowano roztwór katepsyny G (Biocentrum, E-002) o stężeniu 1,176 mg/ml. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem fosforanowym (100 mM fosforan sodu, 150 mM chlorek sodu, pH 7,2) tak, że końcowe stężenie enzymu wynosiło kolejno 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,5625 µg/ml, 0,78125 µg/ml, 0,390625 µg/ml. Z otrzymanych roztworów pobrano po 20 µl i przeniesiono do osobnych probówek. Do każdej z probówek dodano po 1 µl roztworu badanego związku Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂ o stężeniu 1 mM sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO). Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C do każdego roztworu dodano następnie bufor redukujący do nakładania próbek do rozdzielu elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po 10 µl z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0,05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rys 4.

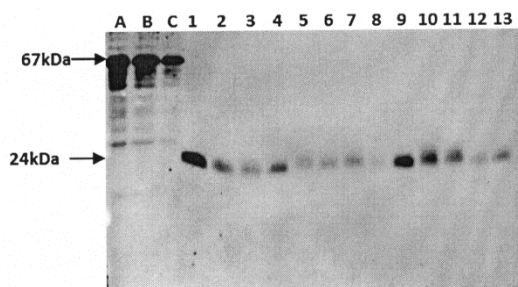


Rys 4. Wyniki analizy western blotting ludzkiej katepsyny G po inkubacji ze związkiem Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂. Oznaczenia: A – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej 4,8 µmoli biotyny/studzienkę. Numery 1–9 odpowiadają katepsynie G po inkubacji z badanym związkiem w ilości naniesionej na studzienkę żelu poliakrylamidowego: 1 – 1000 ng; 2 – 500 ng; 3 – 250 ng; 4 – 125 ng; 5 – 62,5 ng; 6 – 31,25 ng; 7 – 15,625 ng; 8 – 7,8125 ng; 9 – 3,90625 ng.

Przykład 19

Detekcja aktywnej enzymatycznie formy trypsyny.

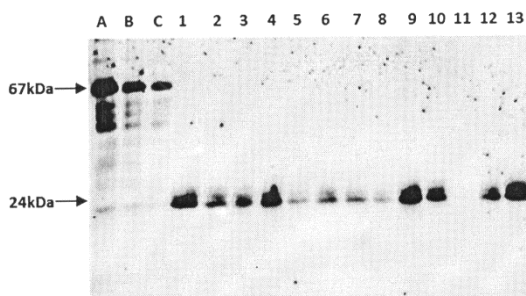
Przygotowano roztwór trypsyny (AppliChem, nr. A-3964.0500) o stężeniu 1,0 mg/ml. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem fosforanowym (100 mM fosforan sodu, 150 mM chlorek sodu, pH 7,2) tak, że końcowe stężenie enzymu wynosiło 10 µg/ml. Z otrzymanego roztworu pobrano po 20 µl i przeniesiono do osobnych probówek. Do każdej z probówek dodano po 1 µl roztworu badanego związku (do każdej probówki inny związek) o stężeniu 1 mM sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO). Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C do każdego roztworu dodano następnie bufor redukujący do nakładania próbek do rozdzielu elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po 10 µl z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0,05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rysunku 5.



Rysunek 5. Wyniki analizy western blotting trypsyny po inkubacji z otrzymanymi związkami. Oznaczenia: A, B, C – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 4,8 (A), 2,4 (B) i 1,2 (C) pmoli biotyny/studzienkę. Numery 1-13 odpowiadają otrzymanym związkom: **1** [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 1], **2** [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 2], **3** [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 3], **4** [Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 4], **5** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-O-CH₃)₂; Przykład 5], **6** [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 6], **7** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 7], **8** [Bt-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 8], **9** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-COOCH₃)₂; Przykład 9], **10** [Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 10], **11** [Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 11], **12** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 12], **13** [Bt-Val-Pro-Abu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 13].

Przykład 20

Detekcja aktywnej enzymatycznie formy ludzkiej neutrofilowej elastazy. Przygotowano roztwór ludzkiej neutrofilowej elastazy (Biocentrum, cat#E-001) o stężeniu 0,625 mg/ml. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem fosforanowym (100 mM fosforan sodu, 150 mM chlorek sodu, pH 7,2) tak, że końcowe stężenie enzymu wynosiło 40 µg/ml. Z otrzymanego roztworu pobrano po 20 µl i przeniesiono do osobnych probówek. Do każdej z probówek dodano po 1 µl roztworu badanego związku (do każdej probówki inny związek) o stężeniu 1 mM sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO). Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C do każdego roztworu dodano następnie bufor redukujący do nakładania próbek do rozdzielu elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po 10 µl z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0,05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rysunku 6.

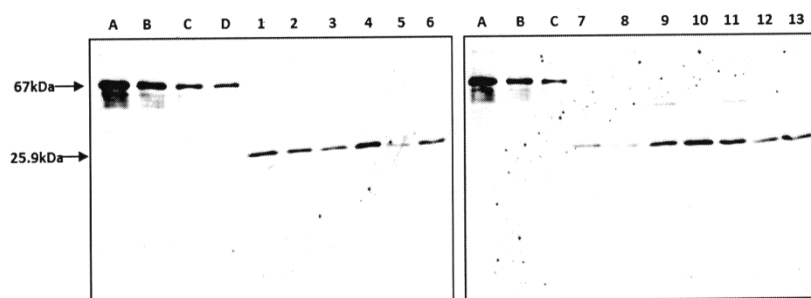


Rysunek 6. Wyniki analizy western blotting ludzkiej neutrofilowej elastazy po inkubacji z otrzymanymi związkami. Oznaczenia: A, B, C – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 4,8 (A), 2,4 (B) i 1,2 (C) pmoli biotyny/studzienkę. Numery 1-13 odpowiadają otrzymanym związkom: **1** [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 1], **2** [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 2], **3** [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 3], **4** [Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 4], **5** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-O-CH₃)₂; Przykład 5], **6** [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 6], **7** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 7], **8** [Bt-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 8], **9** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-COOCH₃)₂; Przykład 9], **10** [Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 10], **11** [Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 11], **12** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 12], **13** [Bt-Val-Pro-Abu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 13].

Przykład 21

Detekcja aktywnej enzymatycznie formy świńskiej elastazy trzustkowej. Przygotowano roztwór świńskiej elastazy trzustkowej (Serva, nr. 20929) o stężeniu 1,0 mg/ml. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem fosforanowym (100 mM fosforan sodu, 150 mM chlorek sodu, pH 7,2) tak,

że końcowe stężenie enzymu wynosiło 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Z otrzymanego roztworu pobrano po 20 μl i przeniesiono do osobnych probówek. Do każdej z probówek dodano po 1 μl roztworu badanego związku (do każdej probówki inny związek) o stężeniu 1 mM sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO). Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C do każdego roztworu dodano następnie bufor redukujący do nakładania próbek do rozdzielu elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po 10 μl z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0,05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rysunku 7.

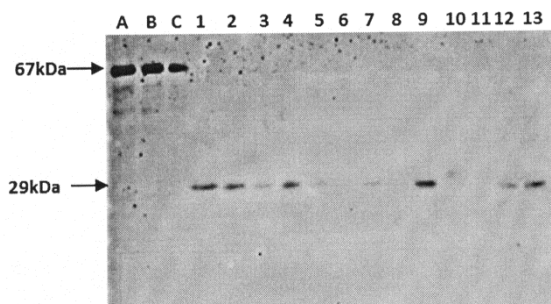


Rysunek 7. Wyniki analizy western blotting świńskiej elastazy trzustkowej po inkubacji z otrzymanymi związkami. Oznaczenia: A, B, C, D – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 4,8 (A), 2,4 (B), 1,2 (C) i 0,6 (D) pmoli biotyny/studzienkę. Numery 1–13 odpowiadają otrzymanym związkom: 1 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 1], 2 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 2], 3 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 3], 4 [Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₅)₂; Przykład 4], 5 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 5], 6 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 6], 7 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 7], 8 [Bt-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 8], 9 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 9], 10 [Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 10], 11 [Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₅)₂; Przykład 11], 12 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 12], 13 [Bt-Val-Pro-Abu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 13].

Przykład 22

Detekcja aktywnej enzymatycznie formy ludzkiej proteiny 3.

Przygotowano roztwór ludzkiej proteiny 3 (Elastin, nr. ML734) o stężeniu 1,0 mg/ml. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem fosforanowym (100 mM fosforan sodu, 150 mM chlorek sodu, pH 7,2) tak, że końcowe stężenie enzymu wynosiło 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Z otrzymanego roztworu pobrano po 20 μl i przeniesiono do osobnych probówek. Do każdej z probówek dodano po 1 μl roztworu badanego związku (do każdej probówki inny związek) o stężeniu 1 mM sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO). Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C do każdego dodano następnie bufor redukujący do nakładania próbek do rozdzielu elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po 10 μl z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0,05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rysunku 8.

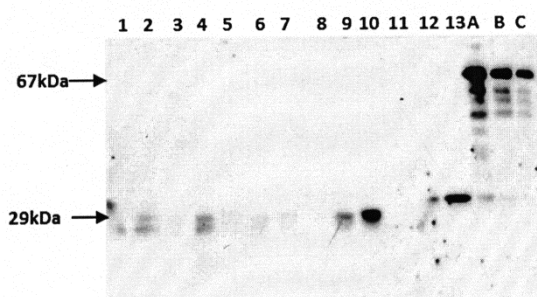


Rysunek 8. Wyniki analizy western blotting ludzkiej proteiny 3 po inkubacji z otrzymanymi związkami. Oznaczenia: A, B, C, D – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 4,8 (A), 2,4 (B), 1,2 (C) i 0,6 (D) pmoli biotyny/studzienkę. Numery 1–13 odpowiadają otrzymanym związkom: 1 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 1], 2 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 2], 3 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 3], 4 [Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 4], 5 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-O-CH₃)₂; Przykład 5], 6 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 6], 7 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 7], 8 [Bt-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 8], 9 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-COOCH₃)₂; Przykład 9], 10 [Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 10], 11 [Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 11], 12 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 12], 13 [Bt-Val-Pro-Abu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 13].

Przykład 23

Detekcja aktywnej enzymatycznie formy chymotrypsyny.

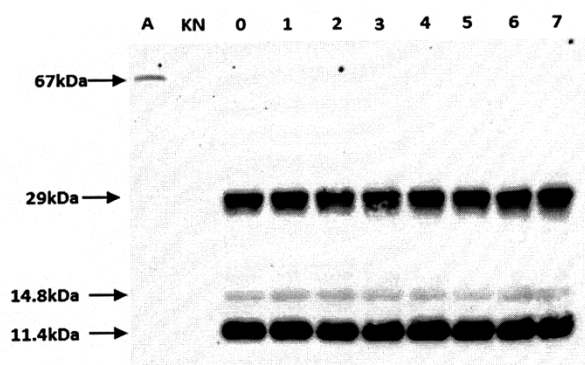
Przygotowano roztwór ludzkiej proteiny 3 (Sigma-Aldrich, nr. C4129) o stężeniu 1,0 mg/ml. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem fosforanowym (100 mM fosforan sodu, 150 mM chlorek sodu, pH 7,2) tak, że końcowe stężenie enzymu wynosiło 62,5 µg/ml. Z otrzymanego roztworu pobrano po 20 µl i przeniesiono do osobnych probówek. Do każdej z probówek dodano po 1 µl roztworu badanego zawiązku (do każdej probówki inny związek) o stężeniu 1 mM sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO). Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C do każdego dodano następnie bufor nieredukujący do nakładania próbek do rozdzielu elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po 10 µl z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0,05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rysunku 9.



Rysunek 9. Wyniki analizy western blotting chymotrypsyny po inkubacji z otrzymanymi związkami. Oznaczenia: A, B, C - kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 4,8 (A), 2,4 (B) i 1,2 (C) pmoli biotyny/studzienkę. Numery 1–13 odpowiadają otrzymanym związkom: 1 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 1], 2 [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 2], 3 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 3], 4 [Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 4], 5 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-O-CH₃)₂; Przykład 5], 6 [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 6], 7 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 7], 8 [Bt-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 8], 9 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-COOCH₃)₂; Przykład 9], 10 [Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 10], 11 [Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 11], 12 [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 12], 13 [Bt-Val-Pro-Abu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 13].

Przykład 24

Określenie wpływu czasu inkubacji związku Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OPh)₂ przedstawionego wzorem 10 z chymotrypsyną na poziom detekcji powstałych kompleksów enzym-badany związek w technice western blotting. Przygotowano roztwór ludzkiej proteiny 3 (Sigma-Aldrich, nr. C4129) o stężeniu 1,0 mg/ml. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem fosforanowym (100 mM fosforan sodu, 150 mM chlorek sodu, pH 7,2) tak, że końcowe stężenie enzymu wynosiło 62,5 µg/ml. Z otrzymanego roztworu pobrano 200 µl i przeniesiono do osobnej probówki a następnie dodano 10 µl roztworu 29 kDa badanego związku Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OPh)₂ o stężeniu 1 mM sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO) i inkubowano w temperaturze 37°C. W określonych odstępach czasu (0, 5, 10, 15, 25, 30, 45 i 60 minut) z mieszaniny reakcyjnej pobrano po 20 µl roztworu i dodano bufor redukujący do nakładania próbek do rozdzielu elektroforetycznego. Ponadto przygotowano w identyczny sposób próbkę kontrolną (kontrola negatywna), w której zamiast badanego związku dodano wyłącznie DMSO. Wszystkie przygotowane w różnych czasach inkubacji próbki zagotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po 10 µl z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0.05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rysunku 10.

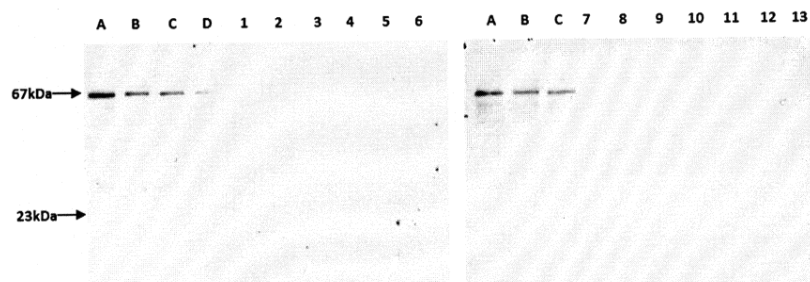


Rysunek 10. Wyniki analizy western blotting chymotrypsyny po inkubacji ze związkiem Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OPh)₂ w zależności od czasu inkubacji. Oznaczenia: A – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 2,4 pmoli biotyny/studzienkę. KN – kontrola negatywna. Numery 0–7 odpowiadają odpowiednim czasom inkubacji: 0 – 0 min, 1 – 5 min, 2 – 10 min, 3 – 15 min, 4 – 25 min, 5 – 30 min, 6 – 45 min, 7 – 60 min.

Przykład 25

Detekcja aktywnej enzymatycznie formy papainy.

Przygotowano roztwór ludzkiej papainy (Sigma-Aldrich, nr. 76216) o stężeniu 25,8 mg/ml. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem octanowym (0,4 M octan sodu, 4 mM EDTA, 8 mM DTT, pH 5,5) tak, że końcowe stężenie enzymu wynosiło 62,5 µg/ml. Z otrzymanego roztworu pobrano po 20 µl i przeniesiono do osobnych probówek. Do każdej z probówek dodano po 1 µl roztworu badanego związku (do każdej probówki inny związek) o stężeniu 1 mM sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO). Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C do każdego dodano następnie bufor redukujący do nakładania próbek do rozdzielu elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po 10 µl z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0.05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rysunku 11.

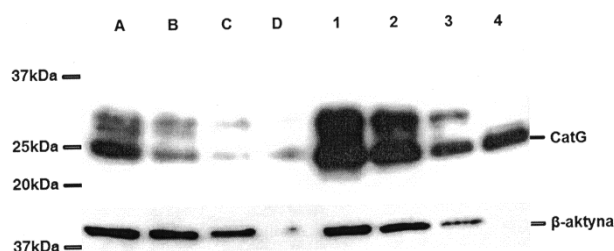


Rysunek 11. Wyniki analizy western blotting papainy po inkubacji z otrzymanymi związkami. Oznaczenia: A, B, C, D – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 4,8 (A), 2,4 (B), 1,2 (C) i 0,6 (D) pmoli biotyny/studzienkę. Numery 1–13 odpowiadają otrzymanym związkom: **1** [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 1], **2** [Bt-Val-Pro-Val^P(OC₆H₅)₂; Przykład 2], **3** [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 3], **4** [Bt-Val-Pro-Ala^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 4], **5** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-O-CH₃)₂; Przykład 5], **6** [Bt-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 6], **7** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₅)₂; Przykład 7], **8** [Bt-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 8], **9** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-COOCH₃)₂; Przykład 9], **10** [Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 10], **11** [Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 11], **12** [Bt-Val-Pro-Leu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 12], **13** [Bt-Val-Pro-Abu^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂; Przykład 13].

Przykład 26

Detekcja aktywnej enzymatycznie formy katepsyny G w lizatach ludzkich komórek krwinek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC).

Komórki poddano lizie stosując bufor 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, pH 7,5 a następnie roztwory doprowadzono do jednakowych wartości całkowitego stężenia białka (oznaczonego testem Bradforda). Pobrano ilość roztworu odpowiadającą 20 µg białka i inkubowano w buforze PBS (pH 7,4) w obecności związku 10 (końcowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 2 µM). Jako kontroli użyto związku Bt-DAP22c (MP Biomedicals) w końcowym stężeniu 2 µM. Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C do każdego roztworu dodano następnie bufor redukujący do nakładania próbek do rozdziału elektroforetycznego i gotowano w 100°C przez 10 minut. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono objętość roztworu odpowiadającą 20 µg, 10 µg oraz 5 µg białka. Po wykonaniu rozdziału elektroforetycznego przeprowadzono elektrotansfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0,05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Detekcji β-aktyny dokonano przy użyciu pierwszorzędowego przeciwciała anty-β-aktyna (mysie przeciwciała anty-aktyna, Sigma-Aldrich, Cat#A2228) i jako drugorzędowego przeciwciała koźłecgo anty-mysiego skoniugowanego zperoksydazą chrzanową (Dianova, Cat# 115–035–003). Odczytu wyników dokonano za kliszy rentgenowskiej (Amersham Hyperfilm TM ECL) przy czasie ekspozycji 60 sekund. Jako substratu użyto zestawu ECL Plus (GE Healthcare). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rysunku 12.



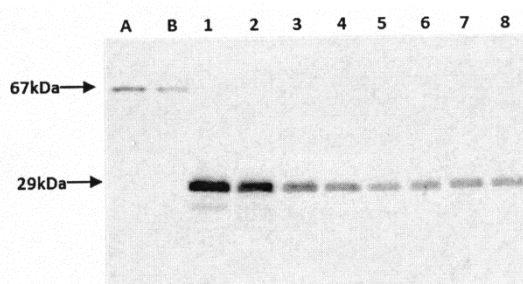
Rysunek 12. Wyniki analizy western blotting lizatów ludzkich komórek krwinek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) po inkubacji ze związkiem **10** [Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe^P(OC₆H₅)₂; Przykład 10]. Oznaczenia: A, B, C – kontrola pozytywna w postaci lizatów (A – 20 µg, B – 10 µg i C – 5 µg) lub czystej katepsyny G (D – 25 ng) inkubowanych ze związkiem Bt-DAP22c (MP Biomedicals); 1, 2, 3 – lizaty (1 – 20 µg, 2 – 10 µg i 3 – 5 µg) lub czysta katepsyna G (4 – 25 ng) po inkubacji ze związkiem 10. Dolny panel przedstawia kontrolę nakładania – β-aktynę.

Przykład 27

Określenie stabilności kompleksu subtylizyny ze związkiem Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂.

Przygotowano wodny roztwór subtylizyny (Sigma-Aldrich z *Bacillus licheniformis*, nr. 85968) o stężeniu 0,8187 mg/ml. Roztwór enzymu rozcieńczono następnie buforem fosforanowym (100 mM fosforan sodu, 150 mM chlorek sodu, pH 7,2) tak, że końcowe stężenie enzymu wynosiło 62,5 µg/ml.

Z otrzymanego roztworu pobrano 200 μ l i dodano 10 μ l roztworu badanego związku Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr-(4-GuPhg)^P(OC₆H₄-4-S-CH₃)₂ (11) o stężeniu 1mM sporządzonego w dimetylosulfotlenku (DMSO). Po inkubacji przez 60 minut w temperaturze 37°C mieszaninę umieszczono w temperaturze pokojowej, a następnie z mieszaniny reakcyjnej pobierano w różnych odstępach czasu (0 min – próbka pobrana po 60 minutowej inkubacji w temperaturze 37°C, 6h, 12h, 24h, 48h, 36h, 60h, 72h) po 20 μ l roztworu i od razu dodawano do niego bufor redukujący do nakładania próbek do rozdzielu elektroforetycznego, a następnie po zagotowaniu w 100°C przez 10 minut zamrażano w temperaturze -20°C. Na studzienki żelu poliakrylamidowego (4%/12%) naniesiono po 10 μ l z otrzymanych roztworów. Po wykonaniu rozdzielu elektroforetycznego przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową w technice western blotting. Membranę następnie zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającego 0.05% Tween-20. Jako czynnika detekcyjnego użyto koniugatu streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Odczytu wyników dokonano za pomocą systemu obrazowania molekularnego (GelLogic1500 Carestream) przy zastosowaniu substratu chemiluminescencyjnego WestPICO Super Signal (Pierce). Uzyskane w technice western blotting rezultaty przedstawione są na Rysunku 13.



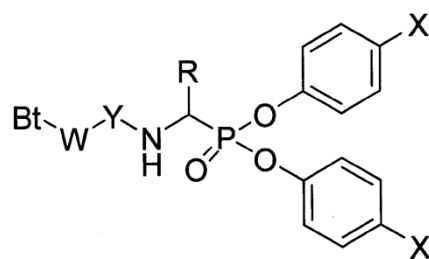
Rysunek 13. Wyniki analizy western blotting subtylizyny pochodzącej z *Bacillus licheniformis* po inkubacji ze związkiem 11 w zależności od czasu inkubacji. Oznaczenia: A, B – kontrola pozytywna w postaci biotynylowanej albuminy wołowej w ilości odpowiadającej kolejno 2,4 (A) i 1,2 (B) pmoli biotyny/studzienkę. Numery 1–8 odpowiadają różnym czasom inkubacji: 1 – 0 min, 2 – 6h, 3 – 12h, 4 – 24h, 5 – 36h, 6 – 48h, 7 – 60h, 8 – 72h.

Zastrzeżenia patentowe

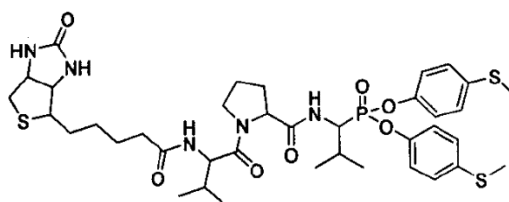
1. Pochodne estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych o wzorze ogólnym I, w którym Bt oznacza biotynę, W oznacza łącznik węglowodorowy składający się od 5 do 10 atomów węgla, Y oznacza reszty aminokwasowe w ilości od 0 do 4, R oznacza podstawnik analogiczny do łańcucha bocznego waliny, alaniny, leucyny, fenyloalaniny, 4-guanidynofenyloglicyny lub kwasu 2-aminobutanowego (Abu); X oznacza wodór lub związek wybrany z grupy obejmującej: merkaptometyl (S-metyl), metoksyl (O-metyl) lub karboksymetyl.
2. Sposób wytwarzania pochodnych estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych o wzorze ogólnym I, w którym Bt oznacza biotynę, W oznacza łącznik węglowodorowy składający się od 5 do 10 atomów węgla, Y oznacza reszty aminokwasowe w ilości od 0 do 4, R oznacza podstawnik analogiczny do łańcucha bocznego waliny, alaniny, leucyny, fenyloalaniny, 4-guanidynofenyloglicyny lub kwasu 2-aminobutanowego (Abu); X oznacza wodór lub związek wybrany z grupy obejmującej: merkaptometyl (S-metyl), metoksyl (O-metyl) lub karboksymetyl, **znamienny tym**, że fosforyn triarlowy, otrzymany z fenolu zawierającego podstawnik w pozycji *para* oraz chlorku fosforu (III) w acetonitrylu, poddaje się amidoalkilowaniu przy użyciu karbaminianu benzylu, fosforynu triarlowego oraz aldehydu, takiego jak aldehyd octowy, propionowy, izomasłowy, fenylooctowy, *p*-nitrobenzoesowy i izowalerianowy, następnie prowadzi się syntezę bromowodorków estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych, w których odblokowuje się ochronną grupę benzyloksykarbonylową (Cbz) a w kolejnym etapie poddaje się reakcji z aminokwasem z zablokowaną grupą α -aminową w obecności odczynnika sprzęgającego, po czym z otrzymanego fosfonodipeptydu po usunięciu grupy blokującej *tert*-butoksykarbonylowej (*t*-Boc) uzyskuje się dipeptyd estru difenylowego kwasu 1-aminoalkanofosfonowego, który poddaje się reakcji w obecności odczynnika sprzęgającego w sposób analogiczny do przedstawionego powyżej z kolejnym aminokwasem z zablokowaną grupą α -aminową, biotyną lub jej pochodną.

3. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako odczynnik sprzęgający stosuje się heksafluorofosforan O-benzotriazol-1-ylo-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy (HBTU) w obecności *N,N'*-diizopropyletyloaminy (DIEA).
4. Zastosowanie pochodnych estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych o wzorze ogólnym I, w którym Bt oznacza biotynę, W oznacza łącznik węglowodorowy składający się od 5 do 10 atomów węgla, Y oznacza reszty aminokwasowe w ilości od 0 do 4, R oznacza podstawnik analogiczny do łańcucha bocznego waliny, alaniny, leucyny, fenyloalaniny, 4-guanidynofenyloglicyny lub kwasu 2-aminobutanowego (Abu); X oznacza wodór lub związek wybrany z grupy obejmującej: merkaptometyl (S-metyl), metoksyl (O-metyl) lub karboksymetyl do wytwarzania leku będącego inhibitorem proteaz serynowych.
5. Zastosowanie *in vitro* pochodnych estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkanofosfonowych o wzorze ogólnym I, w którym Bt oznacza biotynę, W oznacza łącznik węglowodorowy składający się od 5 do 10 atomów węgla, Y oznacza reszty aminokwasowe w ilości od 0 do 4, R oznacza podstawnik analogiczny do łańcucha bocznego waliny, alaniny, leucyny, fenyloalaniny, 4-guanidynofenyloglicyny lub kwasu 2-aminobutanowego (Abu); X oznacza wodór lub związek wybrany z grupy obejmującej: merkaptometyl (S-metyl), metoksyl (O-metyl) lub karboksymetyl, jako niskocząsteczkowych sond molekularnych do wykrywania aktywnych katalitycznie form enzymów.

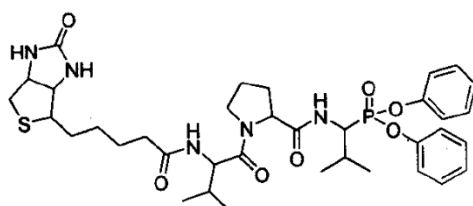
Rysunki



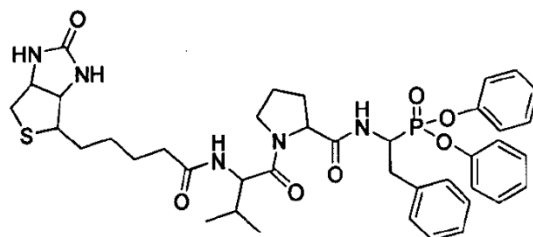
Wzór ogólny I



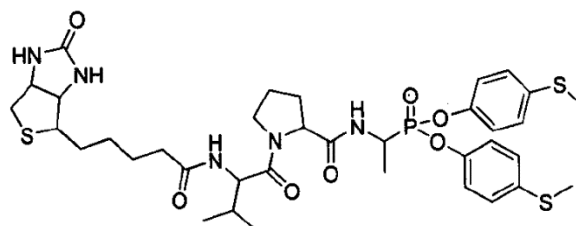
Wzór 1



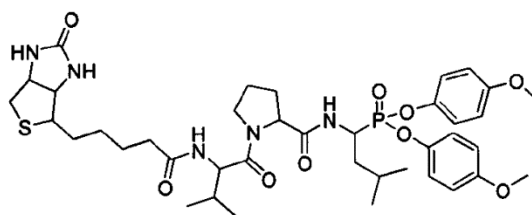
Wzór 2



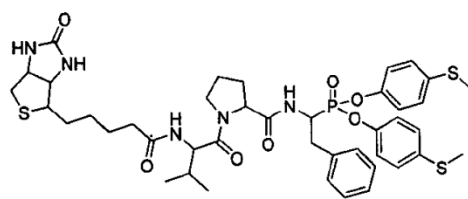
Wzór 3



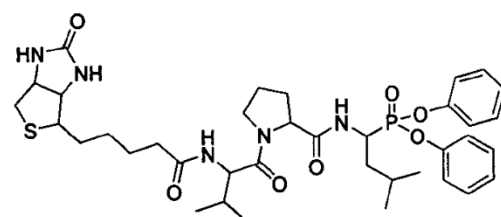
Wzór 4



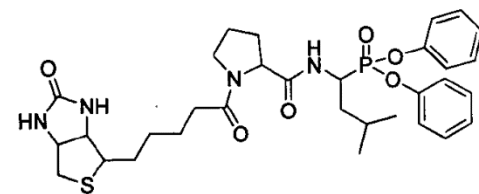
Wzór 5



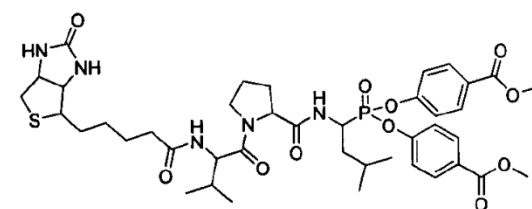
Wzór 6



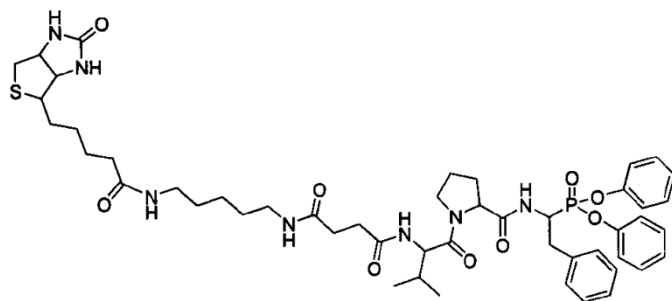
Wzór 7



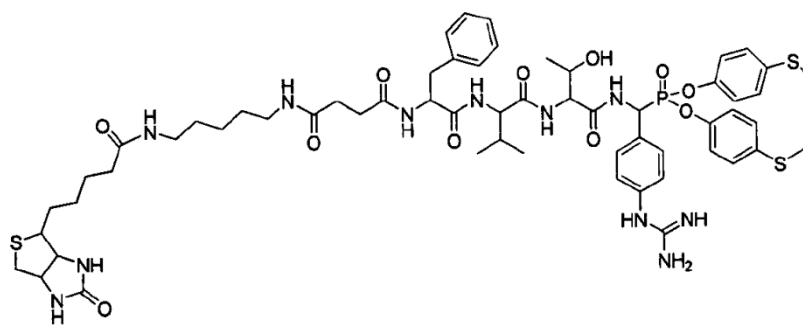
Wzór 8



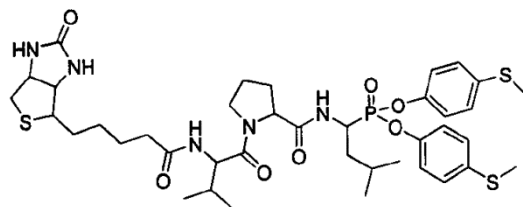
Wzór 9



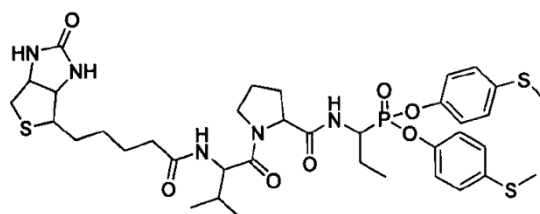
Wzór 10



Wzór 11



Wzór 12



Wzór 13

