

FLUOROWANY MOTYW W AKTYWNYCH BIOLOGICZNIE PEPTYDOMIMETYKACH

FLUORINATED MOTIF IN BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDOMIMETICS

Katarzyna Koroniak-Szejn*, Magdalena Rapp

*Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 60-614 Poznań
e-mail: katarzyna.koroniak@amu.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Wpływ atomu fluoru na oddziaływania w peptydach i białkach
 2. Fluor i właściwości kwasowo – zasadowe
 3. Atom fluoru i fluorowany motyw jako bioizosteryczne analogi wodoru, tlenu, grupy hydroksylowej oraz tiolowej
 - 3.1. Efekt konformacyjny
 - 3.2. 4-Fluoroprolina jako odpowiednik hydroksyproliny
 4. Grupa fluorowinylova jako bioizosteryczny odpowiednik wiązania amidowego
 5. Grupa trifluorometylova w peptydomimetykach
 - 5.1. Grupa trifluorometylova jako odpowiednik wiązania peptydowego
 - 5.2. Grupa trifluorometylova jako zamiennik grupy karbonylowej
 - 5.3. Grupa trifluoroetyloaminowa jako funkcjonalny odpowiednik ugrupowania amidowego
 - 5.4. Zastosowanie zawierających grupę CF₃ analogów etyloglicyny, leucyny, izoleucyny oraz alaniny w peptydach
 6. Zastosowanie fluorowanych analogów etyloglicyny oraz propyloglicyny w peptydach
 7. Zastosowanie fluorowanych analogów proliny w peptydach
 8. Fluorowane fosfoniany
- Uwagi końcowe
Piśmiennictwo cytowane
-



Dr Katarzyna Koroniak-Szejn w 2005 roku ukończyła studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Następnie, w 2008 obroniła doktorat w Niemczech na Westfälische-Wilhelms Universität w Münster, który zrealizowała w grupie badawczej Profesora Günter'a Haufe. Kolejne dwa lata (2009 - 2011) spędziła na stażu podoktorskim w Karlsruhe Institute of Technology w grupie Profesora Stefana Bräse. Obecnie pracuje jako adiunkt na Wydziale Chemii UAM zajmując się przede wszystkim syntezą fluorowanych związków organicznych o potencjalnej aktywności biologicznej, pochodnych cukrów i aminokwasów.



<https://orcid.org/0000-0002-1815-6746>



Prof. UAM, dr hab. Magdalena Rapp ukończyła studia chemiczne o specjalności chemii środowiska w roku 1999 na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W roku 2003 obroniła doktorat związany z syntezą i fotochemią pirymidyn pod kierunkiem Prof. Krzysztofa Golankiewicza na tym samym wydziale. W okresie 2004-2006 odbyła staż podoktorski w grupie Prof. Stanisława Wnuka na uniwersytecie FIU w Miami, w Stanach Zjednoczonych, gdzie zdobyła doświadczenie w chemii cukrów i nukleozydów. W 2006 r. rozpoczęła pracę jako adiunkt w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych na Wydziale Chemii UAM w grupie badawczej Prof. Henryka Koroniaka. W roku 2019 uzyskała habilitację za pracę związaną z syntezą analogów

związków pochodzenia naturalnego. Jej zainteresowania badawcze skupiają się wokół zarówno klasycznej, jak i nowoczesnej syntezy organicznej, a szczególnie chemii organicznych związków fluoru oraz fosforu.



<https://orcid.org/0000-0001-9302-4922>

ABSTRACT

Incorporation of fluorine atom or fluoroalkyl group into molecules, often induces a remarkable effect upon the physical and chemical properties leading to significant changes of its reactivity [1-5], therefore this modification is often used in the synthesis of drugs and biologically active compounds [6, 7]. The change in reactivity has far-reaching consequences, affects bond energy in the molecule, acidity and alkalinity, hydrogen bond formation and the geometry of the molecule [1-5]. The change in acid-base properties and polarity forced by a fluorine or fluorinated motif in the modified amino acid or peptide molecule has already found numerous applications in bioisosteric mimetics [9]. In addition, using a fluorine atom as a probe, conformation determination and stereochemistry of receptor interaction become more effective due to the possibility of using ^{19}F NMR spectroscopy. The stereoselective introduction of fluorine atoms can therefore be exploited as a conformational tool for the synthesis of shape-controlled functional molecules. Particular attention has been paid to fluorinated peptidomimetics due to the huge variety of their biological activity. Proteins play a significant role in drug design and synthesis. Peptide binding in living organisms is quite labile which is associated with the presence of proteolytic enzymes. Therefore, to prevent protein hydrolysis, new, modified compounds are thought to mimic the properties and functions of peptide bond. These types of compounds are called peptidomimetics. In this monograph, we will focus on the biologically active fluorinated peptidomimetics, in which the amide bond has been replaced by a fluorinated group and thus they can "mimic" peptide bond functions (pseudopeptides). Other peptidomimetics with typical amide bond, but in which the remaining part of the molecule has been modified by introducing a fluorinated group or fluorine (peptide analogs) will also be discussed. The main goal of this work, however, is to demonstrate the beneficial effect of fluorine on the properties of the modified compounds and associated with it consequences.

The superior goal of this work, however, is to demonstrate the unique effect of fluorine on the properties of the target compounds and in the design of higher order structures reflecting a more sophisticated molecular construction that broadens biological mimesis.

Keywords: peptidomimetics, fluoromimetics, trifluoromethyl group, fluorine, fluorovinyl group, biological activity

Słowa kluczowe: peptydomimetyki, fluoromimetyki, grupa trifluorometylowa, fluor, grupa fluorowinyłowa, aktywność biologiczna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

3F-GABA	– kwas 3-fluoro- γ -aminomasłowy
3F-NMDA	– kwas 3-fluoro- <i>N</i> -metylo- <i>D</i> -asparaginowy
4-FGlu	– kwas 4-fluoro-glutaminowy
4F-Pro	– 4-fluoroprolina
Ala	– alanina
Alr	– racemaza alaninowa
ASA-DH	– dehydrogenaza semialdehydu asparaginianowego
c-Hex-Gly	– cykloheksyloglicyna
DfeGly	– γ,γ -difluoroetyloglicyna
DfpGly	– γ,γ -difluoropropyloglicyna
diF-GABA	– kwas difluoro- γ -aminomasłowy
DOPr	– receptor δ -opiodowy
DPP	– dipeptydylopeptydaza
F-Hyp	– 3-fluoro-4-hydroksyprolina
GABA	– kwas γ -aminomasłowy, ang. γ -Aminobutyric Acid
GABA-TA	– transaminaza kwasu γ -aminomasłowego
Gln	– glutamina
Glu	– kwas glutaminowy
HCV	– wirusowe zapalenie wątroby typu C
HCV NS3	– białko niestrukturalne wirusa zapalenia wątroby typu C, (ang. Nonstructural Protein 3 hepatitis C virus)
HfLeu	– heksafluoroleucyna
HIF	– Czynniki indukowane przez hipoksję (niedotlenienie), (ang. Hypoxia-Inducible Factor)
HIV	– Ludzki wirus niedoboru odporności, ludzki wirus upośledzenia odporności (ang. Human Immunodeficiency Viruse)
Hyp	– 4-hydroksyprolina
IC ₅₀	– stężenie hamujące substancji o 50% (ang. Inhibitory Concentration).
Ile	– izoleucyna
K _i	– stała inhibicji
KOPr	– receptor κ -opiodowy
Leu	– leucyna
Linia CCRF-CEM	– ludzkie komórki nowotworowe ostrej białaczki limfoblastycznej
MfeGly	– γ -monofluoroetyloglicyna
MMP	– metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej
MOPr	– receptor μ -opiodowy
NMDA	– kwas <i>N</i> -metylo- <i>D</i> -asparaginowy

NTS1, NTS2	– receptory neurotensyny 1 oraz 2
Phe	– fenyloalanina
Pro	– prolina
PROTAC	– chimera ukierunkowana na proteosomalną degradację (ang. Proteolysis Targeting Chimera)
PTH	– nadczynność przytarczyc (łac. hyperparathyreosis), (ang. Parathyroid hormone)
PTP1B	– fosfataza fosfotyrozynowa 1B
RP-HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconej fazie (ang. Reversed High Performance Liquid Chromatography)
Ser	– seryna
TfAla	– trifluoroalanina
TfeGly	– γ, γ, γ -trifluoroetyloglicyna
TfIle	– trifluoroizoleucyna
Tyr	– tyrozyna
Val	– walina
VHL	– białko von Hippel-Lindau

WPROWADZENIE

Wprowadzenie atomu fluoru lub grupy fluoroalkilowej do cząsteczki organicznej może wpłynąć na zmianę jej właściwości fizykochemicznych, a także reaktywności [1-5], dlatego też modyfikacja taka jest często stosowana w syntezie leków oraz związków aktywnych biologicznie [6, 7]. Zmiana reaktywności niesie za sobą dalekie konsekwencje, ponieważ wpływa na energię wiązań w cząsteczce, kwasowość i zasadowość, tworzenie wiązań wodorowych oraz geometrię cząsteczki [1-5]. Wiązanie utworzone pomiędzy atomem fluoru a atomem węgla jest niezwykle silne, jego energia dysocjacji wynosi $116 \text{ kcal mol}^{-1}$, co sprawia, że jest to najsilniejsze wiązanie jakie jest w stanie utworzyć atom węgla z innym pierwiastkiem (dla porównania 99 kcal mol^{-1} dla C–H, 79 kcal mol^{-1} dla C–Cl) [8]. Sprawia to, że fluorowane związki aktywne fizjologicznie są stosunkowo odporne na działanie kwasów i zasad, czynników utleniających czy też degradację metaboliczną. Bardzo wysoka elektroujemność atomu fluoru według skali Paulinga (3,98), mały rozmiar, obecność trzech wolnych par elektronowych i nakładanie się orbitalu 2s lub 2p z odpowiednim orbitalem atomu węgla sprawiają, że atom fluoru połączony bezpośrednio z atomem węgla jest zawsze podstawnikiem wyciągającym elektrony ($\sigma_I > 0$ – ze względu na efekt indukcyjny). We fluorowanych związkach organicznych wiązania są silnie spolaryzowane, na atomie fluoru obecny jest cząstkowy ładunek ujemny (δ^-), a na atomie węgla o hybrydyzacji sp^3 - dodatni (δ^+). Jednakże, gdy atom fluoru jest przyłączony do atomu węgla o hybrydyzacji sp^2 staje się również podstawnikiem dostarczającym elektrony ze względu na efekt rezonansowy ($\sigma_R < 0$) [1-5]. Ze względu na podobieństwo steryczne lub polarne atomu fluoru do innych atomów lub grup atomów, fluorowane związki organiczne mogą być rozważane jako analogi m.in. alkoholi, eterów, ketonów, amidów czy aminokwasów. Zmiana właściwości kwasowo-zasadowych i polarności wymuszona przez fluor lub fluorowany motyw w cząsteczce zmodyfikowanego aminokwasu lub peptydu znalazła już liczne zastosowania w bioizosterycznych mimetykach [9]. Ponadto, stosując atom fluoru jako sondę, bardziej skuteczne staje się określenie konformacji i stereochemii interakcji z receptorem dzięki możliwości zastosowania spektroskopii ^{19}F NMR. Szczególną uwagę zwrócono na fluorowane peptydomimetyki ze względu na ogromną różnorodność ich aktywności biologicznej. W projektowaniu i syntezie leków znaczącą rolę odgrywają białka. Białka zbudowane są z połączonych poprzez wiązanie peptydowe (amidowe) aminokwasów. Wiązanie peptydowe w organizmach żywych jest dość labilne co związane jest z obecnością enzymów proteolitycznych. Stąd, aby zapobiec hydrolizie białek, poszukuje się nowych rozwiązań i połączeń, naśladujących właściwości i funkcje wiązania peptydowego. Tego typu związki nazywa się peptydomimetykami. W literaturze istnieje wiele doniesień i przykładów peptydomimetyków. W tej monografii skupimy się na wykazujących aktywność biologiczną fluorowanych peptydomimetykach, w których wiązanie amidowe zostało zastąpione przez fluorowaną grupę i dzięki temu mogą one

„naśladować” funkcje wiązania peptydowego (pseudopeptydy). Omówione zostaną także inne peptydomimetyki, w których istnieje typowe wiązanie amidowe, ale pozostała część cząsteczki została zmodyfikowana poprzez wprowadzenie fluorowanej grupy lub podstawnika fluorowego (analogi peptydów). Nadrzędnym zadaniem tej pracy jest wykazanie wpływu fluoru na właściwości omawianych związków.

1. WPŁYW ATOMU FLUORU NA ODDZIAŁYWANIA W PEPTYDACH I BIAŁKACH

Zastosowanie zawierających fluorowany motyw peptydomimetyków oraz wprowadzenie fluorowanych analogów aminokwasów do łańcucha peptydowego lub białek pozwoliło nie tylko na określenie właściwości fizyko-chemicznych białek (konformacji, topologii, autoasocjacji), ale także na badania strukturalne związane również z trzecio- i czwartorzędowymi strukturami białek oraz ich stabilnością. Włączenie atomu fluoru do docelowej cząsteczki zmienia właściwości biofizyczne, w tym rozpuszczalność, lipofilowość, konformację i stabilność metaboliczną, które z kolei wpływają na jakość wiązania związku z receptorem oraz jego usuwanie. Tego typu modyfikacje pozwalają również na kontrolę tworzenia trójwymiarowej struktury i dynamiki molekularnej otrzymanych związków. Obecność fluoru w omawianych związkach wpływała na uzyskanie lepszej przenikalności przez błony biologiczne czyli możliwości transportu substancji aktywnych w komórce co zostało wykorzystane do określenia efektów terapeutycznych [10-12].

2. FLUOR I WŁAŚCIWOŚCI KWASOWO-ZASADOWE

Inkorporacja do związku organicznego bardzo elektroujemnego atomu fluoru może wpływać zarówno na kwasowość sąsiednich atomów wodoru oraz takich grup jak ugrupowanie karboksylowe, amidowe oraz alkoholi jak i na zasadowość znajdujących się w bliskim sąsiedztwie grup aminowych [3]. Określono, że obecność pojedynczego podstawnika fluorowego w pozycji β , γ lub δ aminokwasu nie ma znaczącego wpływu na kwasowość odpowiedniej grupy karboksylowej. Kwas γ -fluoro- α -aminomasłowy charakteryzuje się mniejszą kwasowością (pK_{COOH} 2,4) niż niefluorowany związek macierzysty (pK_{COOH} 2,3), podczas gdy trifluorometyloalanina wykazuje charakter bardziej kwasowy (pK_{COOH} 1,6) niż Ala (pK_{COOH} 2,4). Z drugiej strony następuje istotny spadek zasadowości grupy aminowej o 0,5 jednostki pod względem wartości pK_{NH_2} dla kwasu γ -fluoro- α -aminomasłowego (pK_{NH_2} 9,2) w porównaniu z jego odpowiednikiem niezawierającym fluoru (pK_{NH_2} 9,7) [13]. Szczególnie tę właściwość wykorzystano w określeniu aktywności biologicznej fluorowanych kwasów glutaminowego oraz

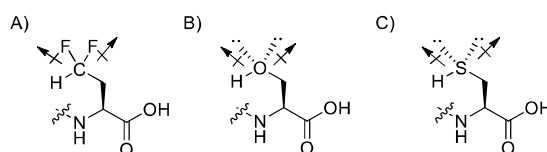
asparaginowego, a także mono- oraz difluorowanych pochodnych waliny, leucyny czy izoleucyny [14]. W żywych komórkach zarówno kwas glutaminowy (Glu), jak i glutamina (Gln) są głównymi źródłami azotu w syntezie niektórych makrocząsteczek. Fluorowane analogi glutaminy mogą zakłócać normalne procesy biochemiczne, w których biorą one udział co stanowi podstawę dla możliwego zastosowania ich jako środków terapeutycznych. Wpływ wprowadzenia atomu(ów) fluoru w pozycję C-4 (γ) kwasu glutaminowego (4-FGlu) wykorzystano w badaniu przesiewowym modulatorów biosyntezy poli- γ -glutaminianów i kwasu foliowego oraz badaniu cytotoksyczności fluorowanych pochodnych antagonistów kwasu foliowego, takich jak metotreksat, będących pochodnymi kwasu glutaminowego. Nie stwierdzono, aby zawierający 4-FGlu analog metotreksatu wykazywał aktywność substratową z syntetazą folipoli- γ -glutaminową izolowaną z ludzkich komórek nowotworowych CCRF-CEM, jednak wykazano, że hamuje ludzką reduktazę dihydrofolianową na podobnym poziomie jak metotreksat [15].

Wprowadzenie grupy trifluorometylowej do cząsteczki również nie pozostaje bez znaczenia dla właściwości kwasowo-zasadowych związków. Przykładowo, kwas trifluoroctowy (pK_{COOH} 0,52) jest zdecydowanie silniejszym kwasem niż kwas octowy (pK_{COOH} 4,76) co bezpośrednio wynika z efektu indukcyjnego wyciągania elektronów przez trzy, silnie elektroujemne atomy fluoru. Grupa trifluorometylowa $-CF_3$ jest grupą objętościową i często jest uznawana za izosteryczną z podstawnikiem izo-propylowym, jak to przykładowo wykazano przy badaniu inhibitorów metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej 9 (MMP-9). Okazało się, że łańcuch alkilowy kończący się grupą metylową lub etylową wywoływał silną aktywność inhibicyjną, podczas gdy odpowiednie homologi izopropylowe były ponad 1000 razy słabsze. Jednakże pochodne podstawione grupą trifluorometylową w dużej mierze zachowały moc mniejszych grup alkilowych. Wyniki te wskazują, że w tym konkretnym kontekście ugrupowanie $-CF_3$ można uznać za bioizosteryczne z mniejszą grupą etylową a nie bardziej objętościową grupą izo-propylową [9].

3. ATOM FLUORU I FLUOROWANY MOTYW JAKO BIOIZOSTERYCZNE ANALOGI WODORU, TLENU, GRUPY HYDROKSYLOWEJ ORAZ TIOLOWEJ

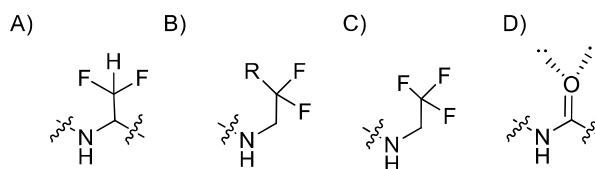
Ze względu na podobieństwo steryczne lub elektronowe atomu fluoru do innych atomów lub grup atomów, fluorowane związki organiczne znalazły liczne zastosowania. Dla porównania, zastąpienie atomu wodoru przez atom fluoru w związkach organicznych nie powoduje zbyt dużych zmian sterycznych i określane jest jako bioizosteryczne [1-5], gdyż promienie van der Waalsa atomu fluoru (1,35 Å) i wodoru (1,20 Å) mają zbliżone wartości [3]. Atom fluoru może

również z powodzeniem zastępować grupę hydroksylową, z którą jest izopolarny, a z kolei grupy difluorometylenowa $-\text{CF}_2-$ czy monofluorometylenowa $-\text{CHF}-$ stosowane są jako zamienniki atomu tlenu, co często wykorzystuje się w syntezie peptydomimetyków. Ugrupowanie CHF_2 (Rys. 1A) bywa często traktowane jako substytut grupy OH (Rys. 1B) lub SH (Rys. 1C) i jest wykorzystywane jako odpowiednik donora wiązań wodorowych lub w celu naśladowania kierunków momentów dipolowych [3, 9].



Rysunek 1. Porównanie właściwości stereoelektronowych oraz wektorów momentów dipolowych w związkach zawierających grupy A) difluorometylową, B) hydroksylową oraz C) tiolową
 Figure 1. Comparison of stereoelectronic properties and dipole moment vectors in compounds containing A) difluoromethyl, B) hydroxyl and C) thiol groups

Podobnie, zastosowane w pozycji α grupy CHF_2 (Rys. 2A), CHF_2CH_2 (Rys. 2B) bądź CF_3CH_2 (Rys. 2C) w aminach uważane jest za funkcjonalny odpowiednik ugrupowania amidowego (Rys. 2D) [9].

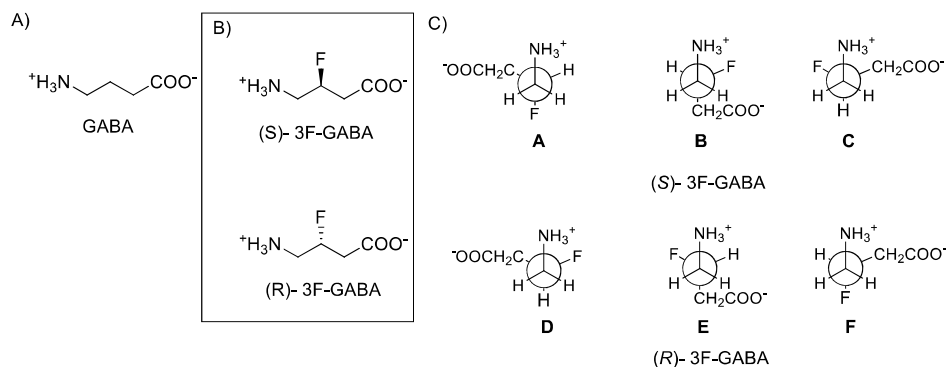


Rysunek 2. Podobieństwo strukturalne ugrupowania difluoroalkiloaminowego (Rys. 2A, 2B), trifluoroalkiloaminowego (Rys. 2C) oraz wiązania amidowego (Rys. 2D)
 Figure 2. Structural similarity of difluoroalkylamine (Fig. 2A, 2B), and trifluoroalkylamine (Fig. 2C) moieties and an amide bond (Fig. 2D)

3.1. EFEKT KONFORMACYJNY

Zrozumienie preferencji układu zawierającego selektywnie wprowadzony atom fluoru w miejscu atomu wodoru bądź grupy hydroksylowej do przyjmowania określonej konformacji może stanowić zaletę do wykorzystania w projektowaniu leków. Polaryzacja wiązania $\text{C}-\text{F}$ ma istotne znaczenie w preferowanym ułożeniu w przestrzeni związków fluoroorganicznych. Na przykład w α -fluoroamidach obserwowana jest znaczna preferencyjność w przyjmowanej konformacji antyperiplanarnej wiązania $\text{C}-\text{F}$ w stosunku do wiązania $\text{C}=\text{O}$, gdyż kierunki

momentów dipolowych wiązań w amidzie oraz C–F są przeciwstawne [16, 17]. Inaczej jest w przypadku oddziaływań spolaryzowanego wiązania C–F wraz z fragmentem cząsteczki posiadającym ładunek formalny, gdzie bardzo często najkorzystniejsza energetycznie jest konformacja *gauche* wynikająca z oddziaływań typu dipol-dipol bądź dipol-jon pomiędzy atomem fluoru oraz grupą NH_3^+ . Oddziaływania te pozwoliły na określenie jak cząsteczka potencjalnego inhibitora (np. protonowana amina) jest zorientowana w miejscu wiązania docelowego enzymu/białka. Jeden z przykładów zastosowania efektu konformacyjnego polegał na wykorzystaniu fluorowanych analogów kwasu γ -aminomasłowego (GABA) (Rys. 3A). GABA hamuje neuroprzebieżność synaptyczną w mózgu ssaków. Istnieją dwie kategorie receptorów GABA: jonotropowe GABA_A i GABA_C oraz metabotropowe receptory GABA_B .

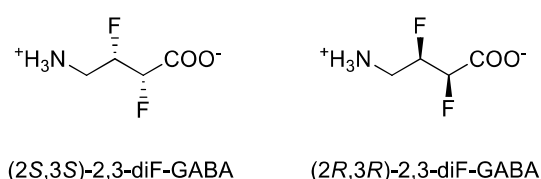


Rysunek 3. A) Kwas γ -aminomasłowy; B) Fluorowane analogi GABA; C) Konformacje naprzemianległe obu enancjomerów 3F-GABA

Figure 3. A) γ -Aminobutyric acid; B) Fluorinated analogues of GABA; C) Staggered conformations of both enantiomers of 3F-GABA

Istnieje duże zainteresowanie identyfikacją ligandów, które są selektywne dla poszczególnych typów tych receptorów gdyż może to być przydatne w leczeniu zaburzeń, w tym bezsenności, lęku i schizofrenii. Oba zawierające fluor enancjomery (S)-3F-GABA oraz (R)-3F-GABA (Rys. 3B) zostały przebadane pod kątem wiązania się z receptorami GABA_A oraz GABA_C [18-21]. Okazało się, że wykazują podobne oddziaływania z receptorem A, z czego wywnioskowano, że odpowiedzialny za wiązanie z receptorem jest najkorzystniejszy energetycznie konformer, w którym największe podstawniki przyjmują położenie *anti*, z atomem fluoru w pozycji *gauche* (konformacja B (S) i konformacja E (R)-3F-GABA, Rys. 3C). Natomiast w przypadku wiązania się analogu GABA z enzymem metabolizującym transaminazą GABA (GABA-TA) oraz GABA_C , enancjomer (R)-3F-GABA posiadał o wiele wyższe powinowactwo do enzymu niż enancjomer (S),

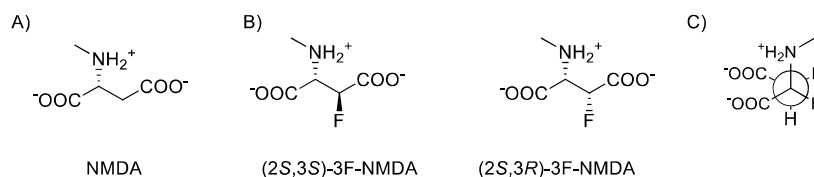
co sugerowało konformację *gauche* największych grup jako „sposób” oddziaływania wraz z dodatkową stabilizacją zapewnioną przez atom fluoru oraz grupę NH_3^+ dyktowaną przez fluor (konformacja **D** (*R*)-3F-GABA, Rys. 3C). Inhibicja GABA-TA daje możliwość łagodzenia objawów zaburzeń związanych z niskim poziomem GABA, w tym chorób Alzheimera i Parkinsona [18-21]. Co więcej przebadanie wicynalnych difluorowanych analogów GABA (Rys. 4) wykazało, że związek (*2S,3S*)-diF-GABA jest lepszym ligandem dla receptora GABA_C , niż GABA_A i GABA_B , podczas gdy jego enancjomer wiąże się zarówno z GABA_A jak i GABA_C [22, 23].



Rysunek 4. Difluorowane analogi kwasu γ -aminomasłowego
 Figure 4. Difluorinated analogues of γ -aminobutyric acid

Interesujące jest to, że zarówno (*2S,3S*)-diF-GABA jak i jego enancjomer przyjmują konformacje tworzące zygzak z powodu preferencji wiązania C-F do przyjmowania konformacji *gauche* zarówno w stosunku do drugiego wiązania C-F jak i C- NH_3^+ , wywołując jednak odmienne efekty. Związek (*2S,3S*)-diF-GABA działa jako agonista podczas gdy jego enancjomer jest antagonistą receptora GABA_C .

Kwas *N*-metylo-D-asparaginowy (NMDA, Rys. 5A) jest agonistą receptorów GluN2A oraz GluN2B należących do grupy jonotropowych receptorów dla glutaminianów.



Rysunek 5. A) Kwas *N*-metylo-D-asparaginowy; B) Fluorowane analogi NMDA; C) Konformacja 3F-NMDA w miejscu aktywnym receptorów GluN2A oraz GluN2B

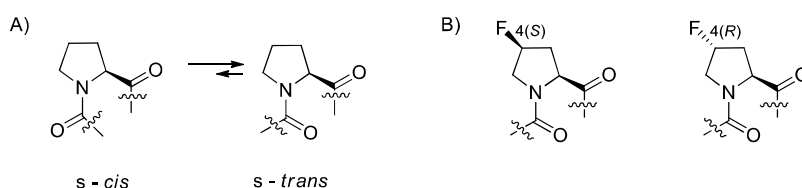
Figure 5. A) *N*-Methyl-D-aspartic acid; B) Fluorinated analogues of NMDA; C) Active conformation of 3F-NMDA at GluN2A and GluN2B receptors

Dwa diastereoizomery (*2S,3S*) oraz (*2S,3R*)-3F-NMDA (Rys. 5B) zostały przebadane pod kątem wiązania się z receptorami NMDA [24]. Okazało się, że

(2*S*,3*S*)-3F-NMDA jest agonistą o sile porównywalnej do samego NMDA, podczas gdy diastereoizomer (2*S*,3*R*) wykazywał znikomą aktywność. Różnicę siły działania tych stereoizomerów przypisano, podobnie jak w powyższych przykładach, preferencji dostosowania wiązania C-F do konformacji *gauche* w stosunku do wiązania C-N⁺ w związku o konfiguracji (2*S*,3*S*)-3F-NMDA (Rys. 5C), podczas gdy w izomerze (2*S*,3*R*)-3F-NMDA nie ma możliwości tego typu stabilizacji. Obserwacje te ilustrują użyteczność stereoselektywnego fluorowania i jego wpływ na konformację molekularną β-fluorowanych aminokwasów, a zatem zbadanie aktywnych konformacji związków bioaktywnych na receptorach.

3.2. 4-FLUOROPROLINA JAKO ODPOWIEDNIK HYDROKSYPROLINY

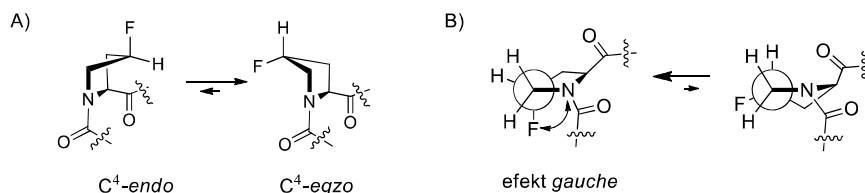
Wprowadzenie atomu fluoru do pierścienia w prolinie (Pro) wpływa zarówno na korzystniejszą energetycznie konformację pierścienia pirolidynowego, jak i na stereochemię *cis-trans* wiązania amidowego w jej pochodnych (Rys. 6A), na przykład w peptydach czy peptydomimetykach. Wpływ ten jest szczególnie widoczny w związkach zawierających atom fluoru w pozycji C-4 pierścienia pirolidynowego.



Rysunek 6. A) Konformacje wiązania amidowego w pochodnych proliny, B) Struktury pochodnych 4-fluoroproliny

Figure 6. A) Conformations of an amide bond in proline derivatives, B) Structures of 4-fluoroproline derivatives

Enancjomer (*R*) zawierający atom fluoru w pozycji 4-proliny [4(*R*)-F-Pro] (Rys. 6B) przesuwa równowagę konformacyjną z upakowania C⁴-*endo* (dominującego dla niemodyfikowanej proliny) w kierunku konformacji C⁴-*egzo* pierścienia (Rys. 7A) [24]. Ułożenie to jest dodatkowo stabilizowane poprzez takie rozmieszczenie dwóch elektrojennych podstawników znajdujących się przy dwóch wicynalnych atomach węgla, że kąt dwuścienny wiązań pomiędzy atomami N-C⁵-C⁴-F wynosi w przybliżeniu 60° (tzw. efekt *gauche*) (Rys. 7B). Konformacja ta pozwala na takie rozmieszczenie grupy karbonylowej *i* aminokwasu, które pozwala na interakcje z grupą C=O aminokwasu (*i*+1), stabilizując wiązanie *trans*-amidowe poprzez nakładanie się orbitalu zawierającego niewiążące elektrony tlenu oraz orbitalu π* pobliskiej grupy CO-NH (oddziaływania n → π*) [25, 26].

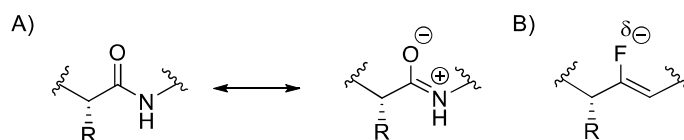


Rysunek 7. A) Preferowane konformacje pierścienia pirolidynowego w pochodnych 4(*R*)-F-Pro; B) Stabilizacja 4(*R*)-F-Pro - tzw. efekt *gauche*
 Figure 7. A) Preferred conformations of pyrrolidine ring in 4(*R*)-F-Pro derivatives; B) Stabilization of 4(*R*)-F-Pro - *gauche* effect

Dla odmiany, w izomerze 4(*S*)-F-Pro (Rys. 6B) przyjmowana jest głównie konformacja C^4 -endo pierścienia pirolidynowego, a na skutek słabszych oddziaływań $n \rightarrow \pi^*$ następuje zmniejszenie preferencji do przyjmowania konformacji *trans* w stosunku do konformacji *cis* wiązania peptydowego (amidowego) [27].

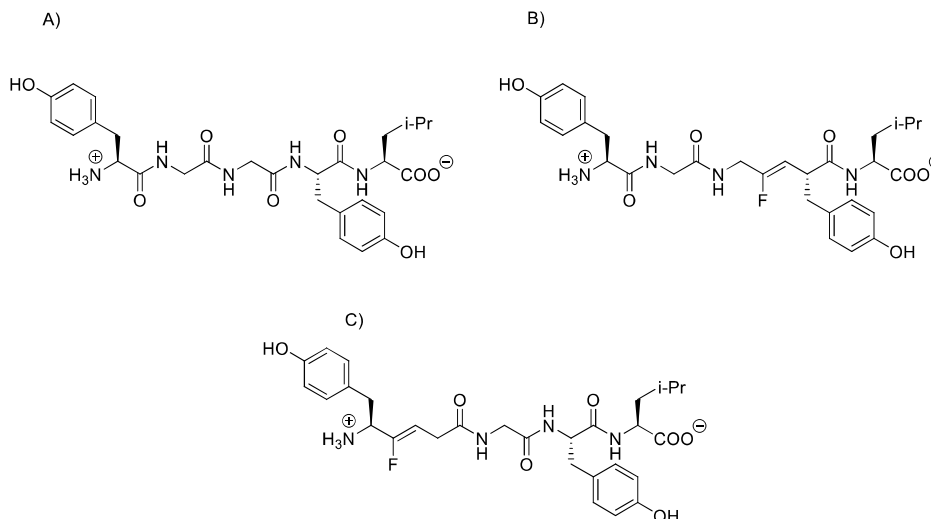
4. GRUPA FLUOROWINYLOWA JAKO BIOIZOSTERYCZNY ODPOWIEDNIK WIĄZANIA AMIDOWEGO

Do innych przykładów grup funkcyjnych, izosterycznych do wiązania peptydowego należy także ugrupowanie monofluorowinyłowe. Wynika to między innymi z podobieństw elektronowych, a także strukturalnych. Wiązanie amidowe można przedstawić jako hybrydę dwóch struktur rezonansowych, wtedy też widać podobieństwo, m.in. geometryczne do fluorowanego alkeny (Rys. 8). W wiązaniu amidowym wolna para elektronowa na atomie azotu jest zdelokalizowana w układzie wiązań π grupy karbonylowej, co powoduje, że wiązanie C-N ma silny charakter wiązania podwójnego. Długość, kąt i sztywność wiązania są bardzo zbliżone we fluoroalkenach i wiązaniach amidowych. Ponadto, atom fluoru jest w stanie w pewnym stopniu naśladować karbonyłowy atom tlenu, ponieważ mają one podobny promień van der Waalsa (1,47 Å dla fluoru i 1,52 Å dla tlenu) [8]. Fluoroalkeny mogą w pewnym stopniu uczestniczyć jako akceptory w wiązaniach wodorowych ze względu na fakt, iż na atomie fluoru zlokalizowany jest częściowy ładunek ujemny, natomiast nie mogą pełnić roli donorów wiązań wodorowych [28].



Rysunek 8. Podobieństwo strukturalne A) wiązania amidowego i B) fluoroalkenu
 Figure 8. Structural similarity of A) an amide bond and B) fluoroalkene

Przykładem peptydomimetyku, w którym wiązanie amidowe zostało skutecznie zastąpione grupą monofluorowinyłową jest analog endogennego neuroprzekaźnika peptydu opioidowego, Leu-enkefaliny. Leu-enkefalina (Rys. 9A) jest pentapeptydem o sekwencji aminokwasów Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, który naturalnie występuje w mózgu wielu zwierząt oraz ludzi.



Rysunek 9. A) Leu-enkefalina oraz B) i C) analogi z wiązaniem fluorowinyłowym
 Figure 9. A) Leu-enkephalin and B), C) and its analogues with fluorovinyl bond

Leu-enkefalina aktywuje δ -opioidowy receptor, ale ze względu na słabe właściwości farmakokinetyczne wywołuje bardzo krótkie działania przeciwbólowe *in vivo* gdyż ten peptyd jest bardzo szybko degradowany przez peptydazy [29]. Wiązania peptydowe, które łączą pięć aminokwasów w Leu-enkefaliny są uważane za wysoce hydrofilowe, co powoduje że nie są raczej zdolne do przekroczenia bariery krew-mózg. Zaprojektowany pentapeptyd, w którym trzecie wiązanie peptydowe zastąpione zostało przez grupę monofluorowinyłową (Rys. 9B) wykazał wysoką, choć nieznacznie niższą niż w wyjściowej Leu-enkefaliny, aktywność względem receptora δ -opioidowego co potwierdziło wstępne tezy, że właśnie

trzecie wiązanie amidowe w Leu-enkefalinie działa przede wszystkim jako akceptor wiązania wodorowego w δ -opiodowym receptorze (DOPr) u myszy.

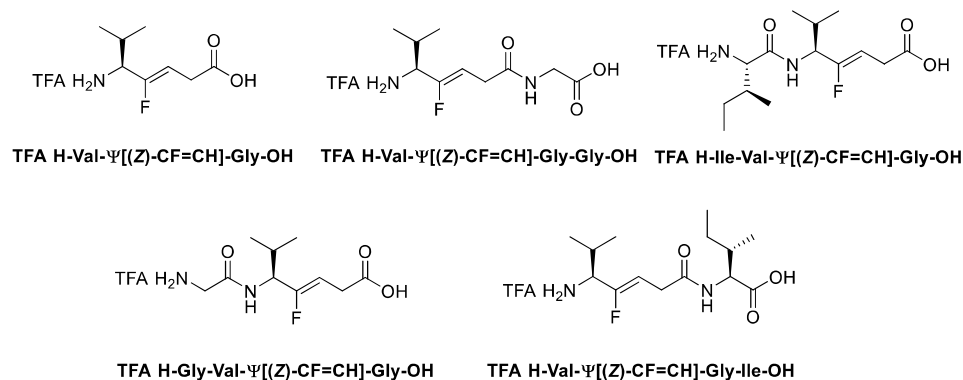
Utrata powinowactwa do DOPr w pentapeptydzie z ugrupowaniem monofluorowinylowym była mniejsza o jeden rząd wielkości, co potwierdza hipotezę, że akceptor wiązania wodorowego jest konieczny w trzeciej pozycji peptydu dla optymalnej komplementarności z DOPr. Zaprojektowany i zsyntetyzowany peptydomimetyk wykazywał natomiast większą lipofilowość niż Leu-enkefalina, wykazując w ten sposób, że podstawienie wiązań amidowych fluoroalkenami w peptydach może być dobrym podejściem do poprawy ich profili farmakokinetycznych [29].

Innym przykładem jest wprowadzenie grupy monofluorowinylowej jako izosteru pierwszego wiązania amidowego pomiędzy Tyr-Gly w Leu-enkefalinie (Rys. 9C) [30]. Jest to dominujące miejsce metabolizmu odpowiedzialne za krótki okres półtrwania i ograniczony rozkład tkanek.

Aktywność opiodową fluorowanego analogu zbadano *in vitro* względem receptorów opiodowych. Otrzymany fluoroalken, analog Leu-enkefaliny zachował aktywność względem DOPr, choć okazała ona się 60-krotnie niższa niż wyjściowego związku. Aktywność ta potwierdza, że obecność wiązania amidowego pomiędzy Tyr – Gly nie jest niezbędna do wiązania się z receptorem DOPr. Podobny trend aktywności okazał się względem receptora μ -opiodowego receptora MOPr. Peptydomimetyk z wiązaniem monofluorowinylowym okazał się aktywnym analogiem, chociaż 45-krotnie mniej aktywnym niż macierzysta Leu-enkefalina [30]. Ta sama grupa badawcza, oprócz badania aktywności analogów Leu-enkefaliny względem receptorów opiodowych wykazała również istotny wpływ na trwałość, stabilność i właściwości metaboliczne powstałego fluorowanego peptydomimetyku. Założeniem projektu było wprowadzenie grupy monofluorowinylowej poprawiającej właściwości fizykochemiczne i biofizyczne docelowych cząsteczek a powstałe analogi, nie powinny być substratem dla endogennych peptydaz. Wynika to z tego, że fluoroalkeny mają podobne momenty dipolowe, potencjał elektrostatyczny, steryczny i rezonansowy. Ponadto wyciągające właściwości atomu fluoru zmniejszają jak już wspomniano wcześniej zasadowość sąsiednich grup funkcyjnych, co czyni te grupy mniej podatnymi na tworzenie wiązania wodorowego z wodą i możliwe, że również z innymi domenami katalitycznymi enzymów metabolizujących. W rezultacie wprowadzenie grupy fluorowinylowej powinno zwiększyć lipofilowość i ułatwić przepuszczalność przez membrany poprzez pasywną dyfuzję. Jak oczekiwano, analog Leu-enkefaliny z ugrupowaniem monofluorowinylowym wykazał doskonałą stabilność. Porównanie trwałości w osoczu szczurzym i ludzkim wykazało zdecydowanie polepszoną stabilność nadaną przez podstawienie wiązania amidowego

ugrupowaniem fluorowinylowym. W osoczu szczura po 4 godzinach pozostało 76% peptydomimetyku, podczas gdy czas półtrwania Leu-enkefalin był krótszy niż 5 minut. W ludzkim osoczu po 4 godzinach pozostało 68% peptydomimetyku, podczas gdy czas półtrwania Leu-enkefalin wynosił 12 minut. Doskonałe działanie peptydomimetyku również potwierdziło się w badaniach *in vivo* i pozytywnie wpłynęło na poprawę dystrybucji leku i właściwości farmakokinetyczne [31].

W literaturze dostępne są też badania wykazujące, że zastąpienie wiązania amidowego jednostką monofluoroalkenową znacznie zwiększa hydrofobowość peptydów jak to wykazano porównując serię dipeptydów i tripeptydów i ich analogów zawierających monofluoroalken (Rys. 10) [32]. W badaniach zastosowano indeksy hydrofobowości (ϕ_0) określone metodą RP-HPLC zgodnie z metodologią opracowaną przez Valkó [33].

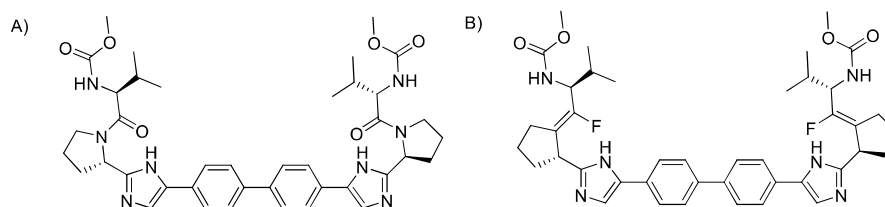


Rysunek 10. Przykłady analogów di- i tripeptydów z ugrupowaniem monofluorowinylowym

Figure 10. Examples of di- and tripeptides with monofluorovinyl moiety

Wprowadzenie wiązania monofluorowinylowego wykorzystano również projektując i syntetyzując peptydomimetyk (Rys. 11B) poprzez modyfikacje inhibitora BMS-790052 (Rys. 11A), który blokuje białko NS5A niezbędne w procesie replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C, HCV. Okazało się, że wprowadzenie tego ugrupowania wiąże się z bardzo silnym działaniem inhibicyjnym w kierunku wirusa HCV [34].

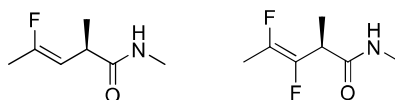
Zbadano również szereg peptydomimetyków hPTH, hormonu przytarczyc (PTH). Badano rolę pierwszej reszty dipeptydowej Ser-Val hPTH zmieniającej wiązanie peptydowe przez różne izostery w tym też z ugrupowaniem monofluorowinylowym. Spośród różnych testowanych analogów pojedynczy związek zawierający fluoroolefinę wykazywał bardzo dobre powinowactwo wiązania i lepszą stymulację produkcji cykazy adenylanowej niż naturalne peptydy w trzech różnych liniach komórkowych stanowiących bardzo silne analogi hPTH [35].



Rysunek 11. A) Inhibitor BMS-790052, B) jego peptydomimetyk z ugrupowaniem fluorowinylyowym
 Figure 11. A) Inhibitor BMS-790052, B) its peptidomimetic with fluorovinyl group

Ponadto zaproponowano również nowe cząsteczki jako silne inhibitory dipeptydylopeptydazy IV (DPP IV). Jest to enzym biorący udział w wielu procesach biologicznych, który mógłby służyć jako cel w leczeniu cukrzycy. Ujawniono, że analog Ala-Ψ [(Z) CF = CH]-Pro ma powinowactwo do enzymów o bardzo dobrym współczynniku hamowania i stabilności [36-39]. W innych badaniach podobnych związków, analogów Gly-Ψ [(Z) CF = CH]-Pro wykazano, że tego typu fluoroolefiny byłyby równie dobrymi inhibitorami dipeptydylopeptydazy II, jak dipeptydylopeptydazy IV [40, 41].

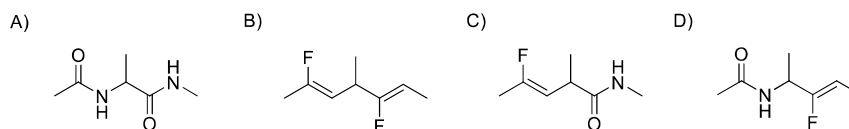
Zainteresowanie wprowadzeniem grupy fluorowinylyowej jako izostery wiązania amidowego okazało się na tyle istotne, że w literaturze pojawiają się doniesienia nie tylko dotyczące syntezy takich układów i badań ich aktywności biologicznej ale także badania teoretyczne dotyczące konformacji tego typu pseudopeptydów jak i wpływu samego podstawnika fluorowego na właściwości związku. Między innymi można spotkać prace, które wskazują, że środowisko chemiczne wokół fluoru, które determinuje przesunięcie chemiczne w widmie ^{19}F NMR, pozostaje nie bez znaczenia dla rozpoznania przez receptor. Zaproponowane w oparciu o zasadę ekranowania peptydomimetyki z wiązaniem fluorowinylyowym (Rys. 12) stanowią potencjalne metabolicznie stabilne i bardzo silne inhibitory reakcji enzymatycznych (np. metylotransferaz białkowych, fosfatazy, proteaz i kinaz), odpowiednie do modelowania interakcji białko-białko [42].



Rysunek 12. Przykładowe peptydomimetyki zaproponowane w oparciu o zasadę ekranowania
 Figure 12. Examples of peptidomimetics proposed based on shielding effects

Celem innej pracy było zbadanie konformacji peptydomimetyków powstałych po zastąpieniu wiązań peptydowych ugrupowaniami fluoroalkenowymi. Analog dipeptydowy alaniny (ADA) wybrano jako związek modelowy. Zbadano teoretycznie trzy układy peptydomimetyków, w tym jeden wytworzony przez zastąpienie obu wiązań peptydowych w ADA oraz tych wytworzonych przez pojedyncze zastąpienie

C-końcowego wiązania peptydowego i *N*-końcowego wiązania peptydowego (Rys. 13). Konformacje dla wszystkich trzech systemów zostały wygenerowane przez wyczerpujące wyszukiwanie w bazie Monte Carlo [43].



Rysunek 13. A) Dipeptyd ADA; B), C), D) Peptydomimetyki z grupą fluorowinyłową, analogi ADA
Figure 13. A) Dipeptide ADA; B), C), D) Peptidomimetics with fluorovinyl groups analogues of ADA

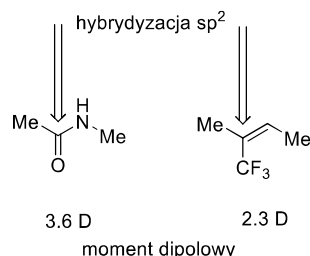
Wykorzystując metody obliczeniowe stwierdzono, że zastąpienie obu wiązań peptydowych w ADA przez wiązanie monofluorowinyłowe (Rys. 13B) miało znaczący wpływ na przewidywany profil konformacyjny cząsteczki. Okazało się, że taki peptydomimetyk nie przyjmuje konformacji, które są reprezentatywne dla konformacji wewnątrzcząsteczkowo związanych wiązaniem wodorowym. Tego typu konformacje zostały natomiast wcześniej zidentyfikowane jako ważny aspekt profilu konformacji ADA. W przypadku peptydomimetyków, które zachowały jedno z dwóch wiązań peptydowych (Rys. 13C i D) geometria wskazuje, że interakcja wewnątrzcząsteczkowa nie jest tak ścisła w przypadku fluoroalkenu, natomiast energia względna tych dwóch konformacji (Rys. 13C i D) jest bardzo zbliżona do ADA.

5. GRUPA TRIFLUOROMETYLOWA W PEPTYDOMIMETYKACH

Przykładem innej grupy, która po wprowadzeniu do cząsteczki peptydów może wpływać na wzrost aktywności biologicznej bądź wywierać pozytywny efekt na inne właściwości np. lipofilowość, rozpuszczalność czy też konformację i stabilność metaboliczną jest grupa trifluorometylowa. Podczas projektowania peptydomimetyków grupę trifluorometylową można wykorzystać na różne sposoby: poprzez zastąpienie wiązania amidowego olefiną z grupą trifluorometylową bądź zastąpienie karbonylowego atomu tlenu grupą trifluorometylową bądź wprowadzenie grupy trifluorometylowej jako podstawnika zachowując nienaruszone wiązanie peptydowe [3, 9].

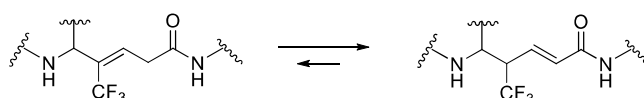
5.1. GRUPA TRIFLUOROMETYLOWA JAKO ODPOWIEDNIK WIĄZANIA PEPTYDOWEGO

Opisano już przykłady, w których wiązanie amidowe zastąpione zostało grupą monofluorowinyłową. Podobnie, w literaturze dostępne są doniesienia dotyczące związków, w których wiązanie peptydowe zastąpiono grupą trifluorowinyłową. Wśród fluorowanych peptydomimetyków trifluorometyloalken (CF_3 -alken) może służyć jako izosteryczny zamiennik wiązania amidowego [44, 45]. Ta podstruktura ściśle naśladuje potencjał elektrostatyczny i kierunek polaryzacji grupy karbonylowej, a także hybrydyzację sp^2 atomu węgla karbonylowego (Rys. 14) [44, 46].



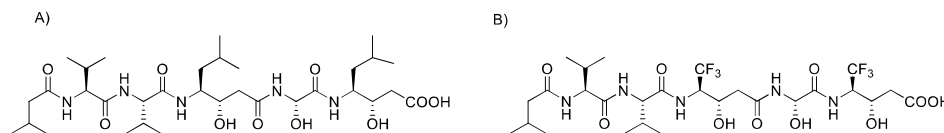
Rysunek 14. Porównanie wiązania peptydowego oraz trifluorometyloalkenu
 Figure 14. Comparison of peptide bond and trifluoroalkene

Włączenie grupy CF_3 -alkenowej korzystnie wpływa na wyższą stabilność termiczną, proteolityczną i konformacyjną oraz lepszą lipofilowość powstałych polipeptydomimetyków [44, 47]. W literaturze można spotkać przykłady tego typu związków, które z sukcesem zastąpiły oryginalne peptydy. Związki te zostały wykorzystane jako cząsteczki sond, w trifluorometyloalkenowym analogu gramicydyny S, który przyjmował podobne do naturalnego peptydu konformacje zarówno w roztworze jak i w stanie stałym [46]. Badano również, wykorzystując metody krystalografii rentgenowskiej analog CF_3 -alkenu dipeptydu L-Ala-D-Ala, który przyjął znacznie bardziej zorganizowaną strukturę pofałdowanych arkuszy β w porównaniu do innych peptydomimetyków [32]. Mimo wielu pozytywnych aspektów, przykłady zastosowania trifluorometyloalkenów jako peptydomimetyków są raczej ograniczone ze względu na możliwość izomeryzacji alkenu (Rys. 15). Ponadto, grupa trifluorometylowa jest zdecydowanie bardziej objętościowa i często, mimo zbliżonych właściwości elektronowych, blokuje wiązanie się z receptorem właśnie ze względu na swoją wielkość [44].



Rysunek 15. Izomeryzacja β,γ -trifluorometyloalkenu do α,β -trifluorometyloalkenu
 Figure 15. Isomerisation of β,γ -trifluoromethylalkene to α,β -trifluoromethylalkene

Co więcej opracowano także metodę syntezy peptydomimetyków Leu-enkefaliny z trifluorometyloolefiną jako zamiennikiem wiązania amidowego, natomiast dotychczas nie zbadano ich aktywności względem receptorów opioidowych [44].

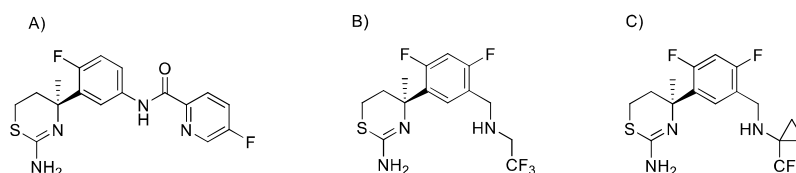


Rysunek 17. A) Pepstatyna A; B) analog z grupą trifluoroetyloaminową
Figure 17. A) Pepstatine A; B) analogue with trifluoroethylamine moiety

Pepstatyna A (Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta) jest inhibitorem wielu proteaz aspartylowych, choć nie jest dobrym inhibitorem proteazy HIV. Podobnie zachował się otrzymany peptydomimetyk nie wykazując inhibicji proteolitycznej. Stwierdzono natomiast znacznie silniejsze działanie hamujące w kierunku plasmepsyny II, proteazy asparaginowej pierwotniaka powodującego najpoważniejsze formy malarii. Ponadto, otrzymany peptydomimetyk (Rys. 17B) okazał się znacznie bardziej selektywny w stosunku do innych, spokrewnionych enzymów, takich jak plasmepsyna IV, a zwłaszcza katepsyna D. Badany związek nie wykazał jednak aktywności w badaniach przeciwmalarycznych opartych na erytrocytach, co wskazało, że posiada niewłaściwy profil farmakologiczny. Otrzymano także szereg analogów inhibitorów MMP (metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej) z grupą trifluorometylową i zbadano ich potencjał inhibicji względem MMP-2, MMP-3 oraz MMP-9. Niestety również w tym przypadku aktywności okazały się znacząco niższe w porównaniu z wyjściowymi związkami, co spowodowane było najprawdopodobniej utrudnioną zdolnością przyjęcia odpowiedniej konformacji względem receptora w związku z obecnością objętościowej i bogatej w elektrony grupy CF₃ [45].

Ugrupowanie trifluoroetyloaminowe wykorzystano również w syntezie inhibitorów BACE-1. Początkowo proces projektowania leku koncentrował się szczególnie na zachowaniu ugrupowania N-H anilidowego (Rys. 18A) [53]. W oparciu o określoną metodami rentgenowskimi strukturę krystaliczną pokrewnego analogu stwierdzono, że obecność ugrupowania anilidowego jest konieczna ze względu na zaangażowanie ugrupowania N-H w interakcję wiązania wodorowego z atomem tlenu grupy karbonylowej Gly₂₃₀ enzymu. Uznano jednak, że ograniczenie konformacyjne nałożone przez płaski pierścień anilidu można zoptymalizować pod kątem interakcji z Gly₂₃₀ poprzez wprowadzenie ugrupowania benzyloaminowego. W ten sposób oczekiwano ortogonalnego układu względem płaszczyzny pierścienia fluorofenyloвого. Początkowa modyfikacja struktury, wprowadzenie grupy trifluoroetyloaminowej, doprowadziła do otrzymania związku (Rys. 18B), który w biochemicznym teście bezkomórkowym okazał się raczej słabym inhibitorem BACE-1 wykazując IC₅₀ = 13,9 μM. Jednakże, w teście komórkowym, związek ten wykazał znacząco wyższą aktywność co przypisano stężeniu podstawowemu leku w kwasowym przedziale endosomalnym, w którym znajduje się BACE-1. W związku z tym dalsze badania koncentrowały się na modulowaniu zasadowości aminy, między innymi poprzez

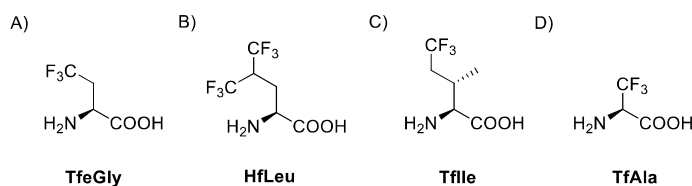
wprowadzenie ugrupowanie CF_3 -cyklopropanowego (Rys. 18C), co zapewniło optymalną równowagę właściwości, a otrzymany związek wykazał $\text{IC}_{50} = 0,069 \mu\text{M}$ [53-56].



Rysunek 18. Inhibitory BACE-1: A) wyjściowy amid; B) oraz C) trifluorometylowane peptydomimetyki
Figure 18. BACE-1 inhibitors: A) original amide; B) and C) trifluoromethylated peptidomimetics

5.4. ZASTOSOWANIE ZAWIERAJĄCYCH GRUPĘ CF_3 ANALOGÓW ETYLOGLICYNY, LEUCYNY, IZOLEUCYNY ORAZ ALANINY W PEPTYDACH

Atom fluoru lub grupa fluoroalkilowa w łańcuchu bocznym w peptydach i ich mimetykach wyraźnie wpływa na polarność cząsteczki ze względu na obecność silnie spolaryzowanych geminalnych i wicynalnych wiązań C-H oraz silnie indukowanego fluorem momentu dipolowego. W związku z tym przeprowadzono badania bazujące na wprowadzeniu trifluorometylowanych aminokwasów jako fragmentów do większych peptydów [46]. Aminokwasy z ugrupowaniem trifluorometylowym jak na przykład γ,γ,γ -trifluoroglicyna (TfeGly), heksafluoroleucyna (HfLeu), trifluoroizoleucyna (TfIle) lub trifluoroalanina (TfAla) (Rys. 19) zostały włączone do peptydów w celu zwiększenia stabilności w kierunku degradacji poprzez proteazy [57-60].

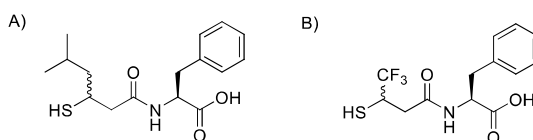


Rysunek 19. Trifluorometylowane aminokwasy
Figure 19. Trifluoromethylated amino acids

Badania wykazały, że trifluoroizoleucyna (Rys. 19C) okazała się szczególnie skuteczna w ochronie peptydów przed proteolizą przez szereg enzymów proteolitycznych, gdy znajduje się na końcu łańcucha przy miejscu cięcia. Natomiast heksafluoroleucyna (Rys. 19B) zwiększa stabilność peptydu glukagonopodobnego-1 (GLP-1) w kierunku proteolizy przez DPP IV, gdy znajduje się bezpośrednio w miejscu cięcia [57, 58, 60].

Opisano również syntezę trifluorometylowanych peptydomimetyków i także ich wpływ na konformację [47]. Przedstawiono syntezę kilku analogów alaniny posiadających grupę trifluorometylową. Konformację szkieletu dla niektórych wybranych peptydomimetyków zanalizowano wykorzystując metodę dyfrakcji rentgenowskiej oraz techniką NMR. Zaobserwowano, że zsyntetyzowane peptydy zawierające trifluoroalaninę zapewniają wstępnie zorganizowany szkielet konformacyjny posiadający elementy strukturalne typu β -zwrotu, chociaż nie zaobserwowano wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego ani w stanie stałym, ani w roztworze. Ten typ peptydomimetyków może być zatem stosowany do indukowania konformacji zbliżonych do pożądanego arkusza β .

Ponadto, wprowadzenie grupy zawierającej atom fluoru do cząsteczki, jako ugrupowania trifluorometylowego może być skuteczną strategią poprawy i modyfikacji profilu biologicznego. Główną zaletą wprowadzenia fluorowanych podstawników w strukturze substancji czynnych jest zwiększenie rozpuszczalności lipidów, a w konsekwencji zwiększenie szybkości wchłaniania i transportu leku przez barierę krew-mózg. Nowy fluorowany tiolowy inhibitor NESS002ie został zsyntezowany jako fluorowany analog *N*-(3-merkapto-5-metylo-1-oksoheksylo)-*L*-fenyloalaniny (C20) (Rys. 20A), który okazał się skuteczny przy leczeniu bólu opartego na strategii hamowania endopeptydazy, chociaż dotychczas nie został przebadany *in vivo*. Z nowych związków we wstępnych testach *in vitro* *N*-(3-merkapto-3-trifluorometylo-1-oksopropylo)-*L*-tyrozyna, NESS002ie (Rys. 20B) wykazała potencjalny profil nocyceptywny. NESS002ie badano, zarówno w testach *in vitro* jak i *in vivo*. Badania wykazały znaczący wzrost aktywności po zastąpieniu łańcucha izobutyloвого tiolu C20 grupą trifluorometylową [61].

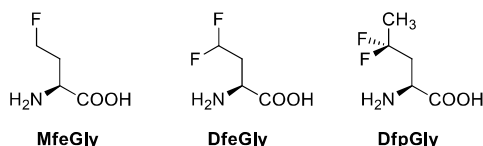


Rysunek 20. A) *N*-(3-merkapto-5-metylo-1-oksoheksylo)-*L*-fenyloalanina; (C20) B) *N*-(3-merkapto-3-trifluorometylo-1-oksopropylo)-*L*-tyrozyna (NESS002ie)

Figure 20. A) *N*-(3-mercapto-5-methyl-1-oxohexyl)-*L*-phenylalanine (C20); B) *N*-(3-mercapto-3-trifluoromethyl-1-oxopropyl)-*L*-tyrosine (NESS002ie)

6. ZASTOSOWANIE FLUOROWANYCH ANALOGOW ETYLOGLICYNY ORAZ PROPYLOGLICYNY W PEPTYDACH

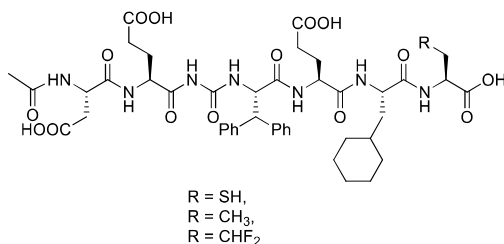
Dobroczynny wpływ atomu fluoru na właściwości peptydów wykazano także dla pochodnych γ -mono- i γ,γ -difluoroetylo glicyny (MfeGly i DfeGly) jak i γ,γ -difluoropropylo glicyny DfpGly (Rys. 21) [11].



Rysunek 21. Mono- oraz difluorowane analogi etyloglicyny oraz propylglicyny
 Figure 21. Mono-, and difluorinated ethylglycine and propylglycine analogues

Okazało się, że w przypadku DfpGly, „objętość” łańcucha bocznego (van der Waalsa) jest zbliżona do przestrzeni zajmowanej przez łańcuch leucyny, a jego hydrofobowość jest obniżona do poziomu nieco niższego niż waliny. Badania te wykazały, że podstawienia atomem fluoru w białku lub peptydomimetyku wpływa w znacznym stopniu na hydrofobowość, polaryzację sąsiednich grup i właściwości bezpośredniego otoczenia [11].

γ,γ -Difluoroetylo glicynę zastosowano także w badaniach właściwości inhibicyjnych proteazy HCV NS3, w którym grupę difluorometylową mającą służyć jako donor wiązań wodorowych zaprojektowano do naśladowania reszty cysteinowej w miejscu P_1 naturalnych substratów (Rys. 22) [62].



Rysunek 22. Analogi heptapeptydu zbadane pod kątem inhibicji proteazy HCV NS3
 Figure 22. Heptapeptide analogues tested toward protease HCV NS3 inhibitions

Satysfakcjonujące podobieństwo (dla $R = \text{CHF}_2$, $K_i = 30 \text{ nM}$) zostało dodatkowo podkreślone przez 20-krotnie zmniejszoną siłę działania obserwowaną dla analogu zawierającego w analogicznej pozycji resztę Ala ($R = \text{CH}_3$, $K_i = 700 \text{ nM}$ podczas gdy dla $R = \text{SH}$, $K_i = 40 \text{ nM}$). Obecność oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy CHF_2 oraz białkiem HCV NS3 została potwierdzona poprzez określenie struktury krystalicznej mniejszych cząsteczek inhibitorów, naśladujących tetraedyczny produkt pośredni w trakcie inhibicji [63].

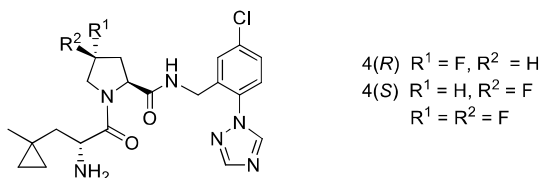
Jako inny przykład wpływu atomu fluoru może posłużyć określenie skłonności oraz kinetyki tworzenia włókien amyloidowych (szkodliwego, nieprawidłowo zwiniętego białka). Czynnikiem brany pod uwagę były ilość i pozycja atomów fluoru oraz wynikająca z tego skłonność do przyjmowania danej struktury

drugorzędowej [64]. Wykorzystano modelowy peptyd (VW18), który w środowisku wodnym przekształca się ze struktury α -helikalnej w bogate w obszary zawierające pofalowane arkusze β włókna amyloidu [65]. Zaobserwowano, że skłonność ta prawdopodobnie związana jest ze stopniem, w jakim początkowa helikalna struktura peptydu była stabilizowana przez wystawioną na działanie rozpuszczalnika resztę aminokwasu w pozycji 13 lub 14 (Leu oraz MfeGly w miejscu Val) lub destabilizowana przez bardziej fluorowane analogi aminokwasów. Dodatkowo, okazało się, że tworzenie włókien przez białko zawierające difluorowaną DfeGly w pozycji 13 lub 14 wykazuje największą zależność od pozycji, co prawdopodobnie odzwierciedla różnice w polarności lokalnego otoczenia. Dalsze badania nad wpływem pojedynczego podstawienia minimalnie fluorowanych bloków budulcowych w hydrofobowym łańcuchu analogu peptydu wykazały, że mogą prowadzić do destabilizacji termicznej. Stopień destabilizacji zależy od tego, jak skutecznie fluorowane jednostki upakują się w sąsiadujące łańcuchy boczne [66-68]. Szczególnie interesujące było stwierdzenie, że spolaryzowana grupa β -metylenowa DfpGly wpływa na stabilność termiczną dimerów łańcuchów w sposób zależny od pozycji.

Charakteryzujące się wysoką wybiórczością w porównaniu z innymi molekułami peptydy i oparte na białkach środki lecznicze cieszą się rosnącym zainteresowaniem lecz niestety posiadają niską stabilność metaboliczną. Jak już wspomniano, w literaturze można jednak znaleźć pewne doniesienia dotyczące polepszenia ich stabilności (chroniące białko przed degradacją), jeżeli do białka wprowadzone zostaną fluorowane bloki budulcowe. Okazało się, że w przypadku enzymów trawiennych takich jak α -chymotrypsyny i pepsyny inkorporacja fluorowanych jednostek w trawionym białku, czyli podstawienie w pozycji P2' DfeGly lub TfeGly (w substracie pepsyny) czy obecność DfeGly w miejscu P2 (w przypadku α -chymotrypsyny) prowadziły do znacznego hamowania hydrolizy wiązań peptydowych [69].

7. ZASTOSOWANIE FLUOROWANYCH ANALOGÓW PROLINY W PEPTYDACH

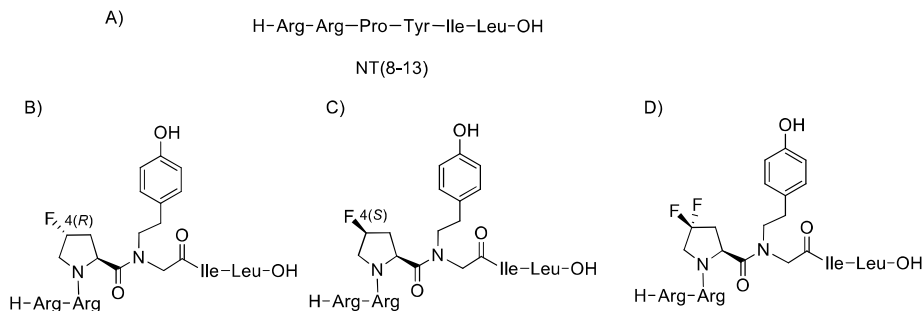
Efekt obniżenia bariery energetycznej izomeryzacji *trans* : *cis* wiązania amidowego oraz przemożny wpływ atomu fluoru na konformację *egzo/endo* pierścienia pirolidynowego wykorzystano w zbadaniu inhibicji trombiny. Otóż, aktywność biologiczna analogów dipeptydów zawierających fluorowaną prolinę związana była z pewną steryczną preferencją. A więc monofluorowany izomer 4(*R*) (Rys. 23) był 300 razy mocniejszy niż jego 4(*S*) (Rys. 23) odpowiednik, podczas gdy geminalny 4,4-difluorek (Rys. 23) był 6 razy słabszy nawet niż nie posiadający fluoru odpowiednik ($R^1, R^2 = H$) [70].



Rysunek 23. Struktury dipeptydowych inhibitorów trombiny zawierające fragment 4(R) lub 4(S) monofluoroproliny lub geminalny 4,4-difluorek proliny

Figure 23. Structures of dipeptides thrombin inhibitors containing 4(R) or 4(S) monofluoroproline or geminal proline 4,4-difluoride

Podobnie wykorzystano także atom fluoru do zbadania wiązania się z receptorem analogu endogennego ligandu wiążącego się z neurotensyną. Receptory neurotensyny 1 oraz 2 (NTS1, NTS2), aktywowane przez neurotransmitter - neurotensynę, przyciągają rosnącą uwagę ze względu na ich efekty fizjologiczne mogące znaleźć zastosowanie zarówno w hipotermii jak i w leczeniu zaburzeń psychicznych. Szczególnie receptor NTS2 jest związany z modulacją wrażliwości na ból. Zastąpienie jednostki proliny w heksapeptydzie NT(8-13) (Rys. 24A) będącym ligandem wiążącym się z neurotensyną, przez zmodyfikowane fluorem w pozycji 4 analogi Pro wykazało, że receptor NTS2 posiada preferencję do wiązania się z peptydomimetykiem zawierającym pierścień pirolidynowy w konformacji *egzo*, który jest stabilizowany przez znajdujący się w pozycji C-4 atom fluoru (tj. 4(R)-F-Pro, Rys. 24B) [71].



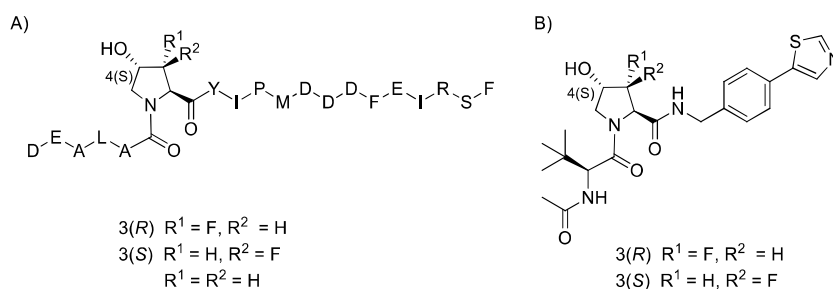
Rysunek 24. A) Heksapeptyd - ligand neurotensyny; B) i C) Monofluorowane oraz D) difluorowane analogi heksapeptydu wiążące receptory NTS1 i NTS2

Figure 24. A) Hexapeptide - neurotensine ligand; B) and C) Monofluorinated and D) difluorinated hexapeptide analogues binding NTS1 and NTS2 receptors

Związek ten oprócz doskonałej zdolności do wiązania się wykazywał też znaczną selektywność do tego receptora. Przeciwnie, pseudopeptyd zawierający enancjomer 4(S)-F-Pro (Rys. 24C) wykazał prawie pięciokrotnie mniejszą zdolność

do wiązania jak i selektywność. Co więcej, geminalny difluorek (Rys. 24D) wykazał większą zdolność do wiązania się niż 4(*R*)-F-Pro (Rys. 24B) dzięki konformacji pierścienia *egzo*, ale za to niską selektywność [$K_i(\text{NTS1})/K_i(\text{NTS2})$]. Okazało się także, że mimetyki heksapeptydu zawierające jeden atom (tj. 4(*R*)-F-Pro) jak i dwa atomy fluoru (Rys. 24), wykazały aktywność, przewyższającą uzyskaną dla endogennego ligandu neurotensyny peptydu NT(8-13). Ma to szczególne znaczenie, gdyż selektywnie wiążący się z receptorem NTS2 ligand może zostać wykorzystany jako środek przeciwbólowy nie wykazujący efektów ubocznych związanych z zastosowaniem opioidów [71].

W przeciwieństwie do F-Pro, wprowadzenie atomu fluoru (w pozycję C-3) do pierścienia pirolidynowego 4-hydroksyproliny (Hyp) zmienia jego preferowaną konformację na C⁴-*endo* zamiast C⁴-*egzo* korzystniejszą energetycznie w przypadku 4-F-Pro. Stwierdzono, że zamiana Hyp na fluorowaną hydroksyprolinę w testowanym ligandzie (HIF-1 α) docelowego białka VHL (białko von Hippel-Lindau), powoduje wysoce stereoselektywne rozpoznawanie przez VHL diastereoizomeru (3*R*,4*S*)-3-fluoro-4-hydroksyproliny w porównaniu z epimerem (3*S*,4*S*)-F-Hyp (Rys. 25A) [72].



Rysunek 25. A) Peptydomimetyk zawierający F-Hyp - ligand VHL; B) Pochodna F-Hyp jako tzw. chimera – służąca degradacji ligazy VHL

Figure 25. A) Peptidomimetic containing F-Hyp - VHL ligand; B) F-Hyp derivatives as chimera – used as ligase VHL destroyer

Przeprowadzone badania wykazały także, że w trakcie wiązania się z białkiem (VHL) równowaga konformacyjna pierścienia pirolidynowego w (3*R*,4*S*)-F-Hyp musi ulec znaczącej zmianie. Przepuszczalnie przejście ze stanu wolnego do związanego musi zostać zrekompensowane przez bardziej korzystne oddziaływania białka z ligandem. Ligandy VHL zawierające F-Hyp zostały zastosowane jako odpowiednie sondy komórkowe i wykorzystane do ukierunkowanej proteasomalnej degradacji ligazy VHL jako tzw. chimera PROTAC. Okazało się także, że wprowadzenie izomeru (3*R*,4*S*)-F-Hyp (Rys. 25B) wpływa na cytotoksyczność, natomiast wbudowanie epimeru (3*S*,4*S*) (Rys. 25B) do badanej sondy doprowadziło

do selektywnej degradacji VHL przy stężeniu nanomolarnym pomimo ~20-krotnie mniejszej zdolności wiązania się z tą ligazą.

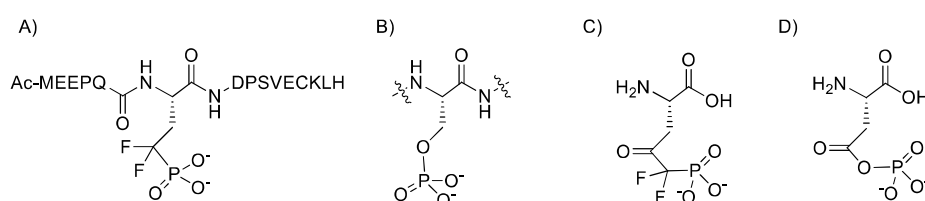
Kolagen jest najobficiej występującym białkiem w organizmach ssaków. Polipeptydowy łańcuch kolagenu zawiera trzy helikalne łańcuchy polipeptydowe, a każda z nich zawiera około 300 powtórzeń sekwencji X-Y-Gly, gdzie X-stanowi jednostki L-proliny (Pro), Y- 4(R)-hydroksyproliny (Hyp), zaś trzecim aminokwasem jest glicyna (Gly). Przyjmowano, że sekwencja ta jest odpowiedzialna za stabilizację łańcuchów kolagenowych, a grupa hydroksylowa Hyp wносиła znaczny wkład na stabilność kolagenu poprzez tworzenie dodatkowych wiązań wodorowych. Teorię tę poddano jednakże w wątpliwość na skutek badań z zastosowaniem 4-fluoroproliny F-Pro jako biozosterycznego odpowiednika 4(R)-hydroksyproliny [73, 74]. Pomimo, że tak zmodyfikowany peptyd nie powinien mieć zdolności do międzyciniowego wiązania wodorowego, wprowadzenie 4(R)-fluoroproliny zaowocowało znacznym zwiększeniem stabilności trójniciowej helisy kolagenu [27, 76]. Zaobserwowano również, że w zależności od wprowadzonego w miejscu Pro-48 enancjomeru F-Pro (R) lub (S) widoczne są przeciwne efekty. Okazało się, że głównym czynnikiem stabilizującym helisy kolagenu jest efekt konformacyjny i przyjmowana konformacja C⁴-egzo pierścienia piperolidinowego korzystniejsza energetycznie w przypadku zarówno Hyp, jak i 4(R)-fluoroproliny oraz obniżona bariera energetyczna izomeryzacji *cis:trans* wiązania peptydowego, pozwalająca na pre-organizację nici wymaganej do utworzenia potrójnej helisy konformacji *trans* wszystkich aminokwasów w peptydzie [25, 26]. W konsekwencji związek przyjmuje ułożenie wiązania C-F, antyrównoległe do trzech najbliższych dipoli C=O potrójnej helisy. Wykazano więc, że to głównie oddziaływania dipol-dipol i odpychanie steryczne reszt proliny i Hyp, a nie wiązania wodorowe nadają kolagenowi taką stabilność.

Tworzenie wiązania peptydowego z proliną w rybosomie przebiega wyjątkowo wolno w porównaniu do wszystkich innych aminokwasów białkotwórczych. Okazało się jednak, że wprowadzenie monofluorowanej 4(R)-F-Pro zwiększa szybkość tworzenia wiązania peptydowego do poziomu obserwowanego w innych aminokwasach proteinogennych, podczas gdy inkorporacja jej diastereomeru 4(S)-F-Pro prowadzi do przeciwnego efektu [77].

8. FLUOROWANE FOSFONIANY

Grupy difluorometylenową -CF₂- oraz monofluorometylenową -CHF- zastosowano także jako zamienniki mostkowego atomu tlenu w fosforylowanych związkach organicznych [-O-P(O)O₂]. Tak otrzymane mono- lub difluorometyleno fosfoniany [-CHF-P(O)O₂⁻ lub -CF₂-P(O)O₂⁻] są stabilne w środowisku biologicznym. Peptydomimetyk (haptens) zawierający ugrupowanie

difluorometylenofosfonianowe (Rys. 26A) wykorzystano do zbadania przeciwciała, które może wywoływać odpowiedź odpornościową jedynie w połączeniu z odpowiednim fosforylowanym białkiem [78]. Jako białko wybrano białko p53 o właściwościach supresora nowotworowego, zaangażowanego w regulację aktywacji mechanizmów naprawy DNA oraz indukcję apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, zawierające w pozycji 6 serynę. Jego aktywacja polega między innymi na jej fosforylacji (Rys. 26B), a grupa difluorometylenowa została wybrana jako substytut tego atomu tlenu w grupie fosforanowej.



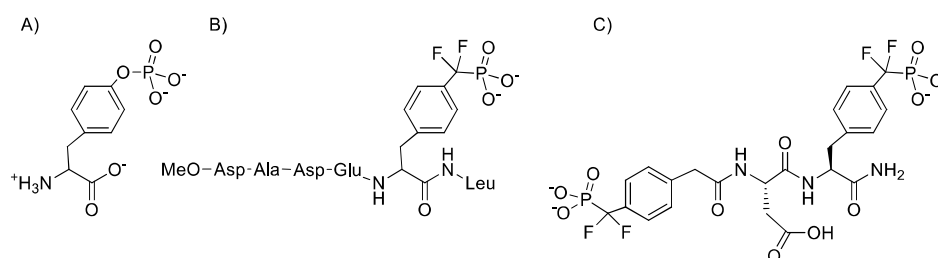
Rysunek 26. A) Peptydomimetyk - wskaźnik przeciwciała ukierunkowanego na 6-fosfoserynową formę białka p53; B) Fragment peptydu zawierający fosfoserynę; C) Difluorowany analog γ -fosforanu asparaginianowego; D) Asparaginiano γ -fosforan

Figure 26. A) Peptidomimetic designed to determine an antibody directed toward 6-phosphoserine in p53; B) Part of peptide containing phosphoserine; C) Difluorinated aspartyl γ -phosphate analogue; D) Aspartyl γ -phosphate

Wybrane przeciwciało rozpoznaje białko p53 tylko kiedy seryna w pozycji 6 jest fosforylowana [79]. Jako inny przykład może także posłużyć zastosowanie difluorometyleno β -keto fosfonianu (Rys. 26C) jako difluorowanego analogu asparaginiano γ -fosforanu (Rys. 26D) – substratu dehydrogenazy semialdehydu asparaginianowego (ASA-DH) [80]. Enzym ten zaangażowany jest w biosyntezę lizyny i jej prekursora- kwasu diaminopimelinowego potrzebnego do biosyntezy peptydoglikanów niektórych ścian bakteryjnych. Po pre-inkubacji inhibitora z enzymem zaobserwowano odwracalną inhibicję poprzez powolne wiązanie się z grupą tiolową w miejscu aktywnym enzymu z grupą karbonylową peptydomimetyku występującego w postaci hydratu difluoroketonu.

Difluorometylenofosfonianowe analogi fosfotyrozyny (Rys. 27A) posłużyły także do określenia budowy inhibitora fosfatazy tyrozynowej. Fosfataza fosfotyrozynowa 1B (PTP1B) pełni ważną rolę w regulacji ścieżki sygnałowej insuliny oraz leptyny. W konsekwencji stanowi ona interesujący cel w leczeniu diabetyków typu II oraz otyłości. Przebadano różnego rodzaju peptydomimetyki, przy czym okazało się, że difluorowany heksapeptyd (Rys. 27B) posiada stosunkowo mocne powinowactwo do PTP1B ($IC_{50} = 0,1 \mu M$), w porównaniu do macierzystego peptydu ($IC_{50} = 200 \mu M$) [81, 82]. Aktywność tę wytłumaczono istnieniem wiązania wodorowego pomiędzy jednym z atomów fluoru reszty

$\text{CF}_2\text{P}(\text{O})(\text{O})_2^-$ oraz atomem wodoru grupy *N*-H fenyloalaniny (Phe182) enzymu [83]. Określono, że obniża on nadekspresję receptora insuliny połączonego z białkiem PTP1B w pewnych formach cukrzycy. Liczne strukturalne modyfikacje badanych fluorowanych fosfonianów posiadających aktywność biologiczną w stosunku do PTP1B pozwoliły na uzyskanie jeszcze lepszych, bardziej selektywnych inhibitorów tej fosfatazy (Rys. 27C) [84, 85].

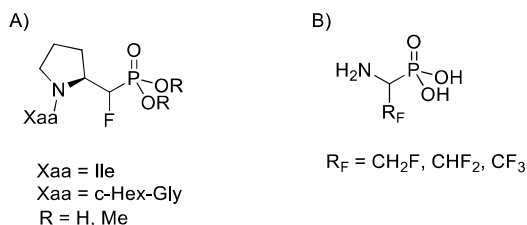


Rysunek 27. Fosfotyrozyna A) oraz jej analogi: B) heksapeptydylo difluorofosfonian, C) peptydylo bis(difluorofosfonian)

Figure 27. Phosphotyrosine A) and analogues: B) hexapeptidyl difluorophosphonate, C) peptidyl bis(difluorophosphonate)

Fluorowane fosfoniany zostały także zastosowane w miejscu grupy karboksylowej w aminokwasach, co pozwoliło na otrzymanie dużej grupy związków takich jak aminofosfoniany, rozpoznawane przez enzymy lub receptory jako fałszywe substraty i przez to posiadające właściwości inhibitoryjne. Z wielu względów α -aminoalkilofosfoniany traktuje się jako doskonałe odpowiedniki aminokwasów [86-89]. Grupa fosfonowa ($-\text{P}(\text{O})(\text{OR})_2$) posiada geometrię tetraedryczną oraz lokalizację ładunków analogiczną do stanu przejściowego powstającego w trakcie przeniesienia grupy acylowej, na przykład w aminokwasach w trakcie reakcji enzymatycznych [79]. Z tego też względu kwasy α -aminoalkilofosfonowe stanowią szeroko adoptowaną grupę służącą do projektowania inhibitorów będących niehydrolizowanymi mimetykami aminokwasów.

Tę szczególną aplikację stanowiło zastosowanie fluorofosfonianowych pochodnych proliny (Rys. 28A) stanowiących analogi stanu przejściowego, w których atom fluoru, mógł działać jako akceptor wiązania wodorowego w trakcie inhibicji selektywnych wobec proliny aminodipeptydaz serynowych. Odcinają one dipeptydy z *N*-końca peptydów lub białek, jeżeli reszta proliny znajduje się w przedostatniej pozycji. Reprezentatywnymi przykładami tej grupy są dipeptydylowe peptydazy II i IV (DPP II i DPP IV). Omawiane enzymy uważane są za ważne w takich stanach chorobowych, jak cukrzyca, nowotwory i zaburzenia związane z odpornością.



Rysunek 28. A) Fluorofosfonianowe pochodne proliny - inhibitory aminodipeptydaz serynowych;
B) Fluorowane kwasy aminoetanofosfonowe- przykładowe inhibitory racemazy alaninowej
Figure 28. A) Fluorophosphate derivatives of proline - inhibitors of serine aminodipeptidases;
B) Fluorinated aminoethane phosphonic acids - examples of alanine racemase inhibitors

Wstępna ocena biochemiczna opisanych związków na jednym z docelowych enzymów, DPP IV, wykazała obiecującą aktywność. Najbardziej aktywnym związkiem okazał się fluorofosfonian (Rys. 28A, Xaa = Ile i R = H, IC₅₀ = 50 μM) [89].

Pomimo znacznej wartości mocy wiązania C-F i względnie słabej zdolności atomu fluoru do bycia grupą opuszczającą, w pewnych okolicznościach dochodzi do eliminacji HF w wyniku przemian metabolicznych tak jak w przypadku dezaktywacji DadB racemazy alaninowej *S. typhimurium* (Alr), opisanej dla inhibitorów β-1(*S*)-fluoroalaniny oraz β-1(*R*)-fluoroalaniny (Rys. 28B, R_F = CH₂F) [91, 92]. Stwierdzono, że w trakcie inhibicji następuje α,β-eliminacja prowadząca do adduktu enolanowej formy kwasu pirogronowego oraz fosforanu pirydoksalu. Redukcja tego trójskładnikowego adduktu z enzymem blokuje ścieżkę eliminacji. Autorzy zaproponowali także ogólny mechanizm dezaktywacji racemaz w świetle tych wyników. Także kwasy β,β-difluoro- oraz β,β,β-trifluoroaminoetanofosfonowe (Rys. 28B, R_F = CHF₂ oraz CF₃) zostały zbadane pod kątem inhibicji Alr. Stwierdzono, że stanowią one zależne od czasu inhibitory Alr, z których najlepsze właściwości przeciwbakteryjne wykazywał monofluorowany analog aminokwasu [91, 92].

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawiona powyżej praca przeglądowa ma służyć (wg Autorów) inspiracji niesamowitym efektem uzyskanym dzięki atomowi fluoru oraz fluorowanego motywu w związkach organicznych, w tym w peptydomimetykach czy fluorowanych analogach aminokwasów i peptydów. Zdajemy sobie sprawę, że pewne aspekty zostały zilustrowane zaledwie przykładami, niektóre zostały potraktowane marginalnie. Istnieje także grupa peptydomimetyków zawierająca fluorowane układy aromatyczne, czy łańcuchy zawierające większą ilość atomów fluoru. Z uwagi na obszerność

przedstawionej powyżej tematyki ten aspekt wpływu fluoru nie został zawarty w monografii.

Należy też pamiętać, że istnieje wiele całkowicie niewykorzystanych oddziaływań wiązania C-F, które oczekują na zbadanie, na przykład w środowisku białkowym, w tym interakcji ładunek-dipol czy koordynacja kationów metali. Co więcej, w niedalekiej perspektywie można oczekiwać wzrostu zastosowania aminokwasów znakowanych radioaktywnie ^{18}F , które mogą naśladować endogenne rozkłady różnych naturalnych aminokwasów, a tym samym służyć jako wskaźniki do badania metodą pozytonowej tomografii emisyjnej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.T. Welch, *Tetrahedron*, 1987, **43**, 3123.
- [2] J. Mann, *Chem. Soc. Rev.*, 1987, **16**, 381.
- [3] J.P. Begue, D. Bonnet-Delpon, *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2008.
- [4] D. O'Hagan, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 308.
- [5] B.E. Smart, *J. Fluorine Chem.*, 2001, **109**, 3.
- [6] W.K. Hagmann, *J. Med. Chem.*, 2008, **51** (15), 4359.
- [7] J. Wang, M. Sánchez-Roselló, J.L. Aceña, C. del Pozo, A.E. Sorochinsky, S. Fustero, V.A. Soloshonok, H. Liu, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 2432.
- [8] J. Emsley, *Chemia. Przewodnik po pierwiastkach*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
- [9] N.A. Meanwell, *J. Med. Chem.*, 2018, **61** (14), 5822.
- [10] C. Jäckel, W. Seufert, S. Thust, B. Koks, *ChemBioChem*, 2004, **5**, 717.
- [11] A.A. Berger, J.S. Völler, N. Budisa, B. Koks, *Acc. Chem. Res.*, 2017, **50**, 2093.
- [12] M. Salwiczek, E.K. Nyakatura, U.I.M. Gerling, S. Ye, B. Koks, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2135.
- [13] G. Haufe, S. Krüger, *Amino Acids*, 1996, **11**, 409.
- [14] X.L. Qiu, W.D. Meng, F.L. Qing, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 6711.
- [15] B. Hart, W. Haile, N. Licato, W. Bolanowska, J. McGuire, J. Coward, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 56.
- [16] C.R.S. Briggs, D. O'Hagan, J.A.K. Howard, D.S. Yufit, *J. Fluorine Chem.*, 2003, **119**, 9.
- [17] J.W. Banks, A.S. Batsanov, J.A.K. Howard, D. O'Hagan, H.S. Rzepa, S. Martin-Santamaria, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1999, **2**, 2409.
- [18] G. Deniau, A.M.Z. Slawin, T. Lebl, F. Chorki, J.P. Issberner, T. van Mourik, J.M. Heygate, J.J. Lambert, L.A. Etherington, K.T. Sillar, D. O'Hagan, *ChemBioChem*, 2007, **8**, 2265.
- [19] I. Yamamoto, G.P. Deniau, N. Gavande, M. Chebib, G.A.R. Johnston, D. O'Hagan, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7956.
- [20] M.D. Clift, H. Ji, G.P. Deniau, D. O'Hagan, R.B. Silverman, *Biochemistry*, 2007, **46**, 13819.
- [21] D.L. Crittenden, M. Chebib, M.J.T. Jordan, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, 2005, **755**, 81.
- [22] L. Hunter, K. A. Jolliffe, M.J.T. Jordan, P. Jensen, R.B. MacQuart, *Chem. - Eur. J.*, 2011, **17**, 2340.
- [23] I. Yamamoto, M.J.T. Jordan, N. Gavande, M.R. Doddareddy, M. Chebib, L. Hunter, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 829.
- [24] P.W. Chia, M.R. Livesey, A.M.Z. Slawin, T. Van Mourik, D.J.A. Wyllie, D. O'Hagan, *Chem. - Eur. J.*, 2012, **18**, 8813.

- [25] C.E. Jakobsche, A. Choudhary, S.J. Miller, R.T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6651.
- [26] R.W. Newberry, B. Van Veller, I.A. Guzei, R.T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 7843.
- [27] J.A. Hodges, R.T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 9262.
- [28] P.A. Champagne, J. Desroches, J.F. Paquin, *Synthesis*, 2015, **47**, 306.
- [29] J.F. Nadon, K. Rochon, S. Grastilleur, G. Langlois, T.T.H. Dao, V. Blais, B. Guérin, L. Gendron, Y. L. Dory, *ACS Chem. Neurosci.*, 2017, **8**, 40.
- [30] S.N. Karad, M. Pal, R.S. Crowley, T.E. Prisinzano, R.A. Altman, *ChemMedChem*, 2017, **12**, 571.
- [31] R.A. Altman, K.K. Sharma, L.G. Rajewski, P.C. Toren, M.J. Baltezor, M. Pal, S.N. Karad, *ACS Chem. Neurosci.*, 2018, **9**, 1735.
- [32] M. Drouin, J. Laxio Arenas, J.F. Paquin, *ChemBioChem*, 2019, **20**, 1817.
- [33] K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, *Anal. Chem.*, 1997, **69** (11), 2022.
- [34] W. Chang, R.T. Mosley, S. Bansal, M. Keilman, A.M. Lam, P.A. Furman, M.J. Otto, M.J. Sofia, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 2938.
- [35] R. Waelchli, R. Gamse, W. Bauer, H. Meigel, E. Lier, J.H.M. Feyen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, **6**, 1151.
- [36] L.G. Boros, B. DeCorte, R.H. Gimi, J.T. Welch, Y. Wuand, R.E. Handschumacher, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 6033.
- [37] J.T. Welch, J. Lin, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 291.
- [38] J. Lin, P.J. Toscano, J.T. Welch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, **95**, 14020.
- [39] K. Zhao, D.S. Lim, T. Funaki, J.T. Welch, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 207.
- [40] P. Van der Veken, I. Kertesz, K. Senten, A. Haemers, K. Augustyns, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 6231.
- [41] P. Van der Veken, K. Senten, I. Kertesz, I. De Meester, A.M. Lambeir, M.B. Maes, S. Scharpe, A. Haemers, K. Augustyns, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 1768.
- [42] C. Dalvit, S.Y. Ko, A. Vulpetti, *J. Fluor. Chem.*, 2013, **152**, 129.
- [43] B.E. McKinney, J.J. Urban, *J. Phys. Chem. A.*, 2010, **114**, 1123.
- [44] V. Eeda, M. Selvaraju, R.A. Altman, *J. Fluor. Chem.*, 2019, **218**, 90.
- [45] M. Zanda, *New J. Chem.*, 2004, **28**, 1401.
- [46] H. Mei, J. Han, K.D. Klika, K. Izawa, T. Sato, N.A. Meanwell, V.A. Soloshonok, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **18**, 111826.
- [47] S. Fustero, G. Chiva, J. Piera, J.F. Sanz-Cervera, A. Volonterio, M. Zanda, C.R. De Arellano, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 3122.
- [48] M. Sani, A. Volonterio, M. Zanda, *ChemMedChem*, 2007, **2**, 1693.
- [49] A. Brusoe, J.F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 8460.
- [50] A. Volonterio, S. Bellosta, F. Bravin, M.C. Bellucci, L. Bruce, G. Colombo, L. Malpezzi, S. Mazzini, S.V. Meille, M. Meli, C. Ramirez de Arellano, M. Zanda, *Chem. Eur. J.*, 2003, **9**, 4510.
- [51] M. Molteni, C. Pesenti, M. Sani, A. Volonterio, M. Zanda, *J. Fluorine Chem.*, 2004, **125**, 1735.
- [52] M. Molteni, M.C. Bellucci, S. Bigotti, S. Mazzini, A. Volonterio, M. Zanda, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2286.
- [53] C.R. Butler, K. Ogilvie, L. Martinez-Alsina, G. Barreiro, E.M. Beck, C.E. Nolan, K. Atchison, E. Benvenuti, L. Buzon, S. Doran, C. Gonzales, C.J. Helal, X. Hou, M.H. Hsu, E.F. Johnson, K. Lapham, L. Lanyon, K. Parris, B.T. O'Neill, D. Riddell, A. Robshaw, F. Vajdos, M.A. Brodney, *J. Med. Chem.*, 2017, **60**, 386.
- [54] G. Chen, H. Ren, A. Turpoff, A. Arefolov, R. Wilde, J. Takasugi, A. Khan, N. Almstead, Z. Gu, T. Komatsu, C. Freund, J. Breslin, J. Colacino, J. Hedrick, M. Weetall, G.M. Karp, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 3942.

- [55] X. Zhang, N. Zhang, G. Chen, A. Turpoff, H. Ren, J. Takasugi, C. Morrill, J. Zhu, C. Li, W. Lennox, S. Paget, Y. Liu, N. Almstead, F.G. Njoroge, Z. Gu, T. Komatsu, V. Clausen, C. Espiritu, J. Graci, J. Colacino, F. Lahser, N. Risher, M. Weetall, A. Nomeir, G.M. Karp, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 3947.
- [56] N. Zhang, X. Zhang, X. J. Zhu, A. Turpoff, G. Chen, C. Morrill, S. Huang, W. Lennox, R. Kakarla, R. Liu, C. Li, H. Ren, N. Almstead, N.S. Venkatraman, F.G. Njoroge, Z. Gu, V. Clausen, J. Graci, S.P. Jung, Y. Zheng, J.M. Colacino, F. Lahser, J. Sheedy, A. Mollin, M. Weetall, A. Nomeir, G.M. Karp, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 2121.
- [57] S. Huhmann, B. Kokschi, *Eur. J. Org. Chem.* 2018, **2018**, 3667.
- [58] H. Meng, S.T. Krishnaji, M. Beinborn, K. Kumar, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 7303.
- [59] V. Asante, J. Mortier, H. Schlüter, B. Kokschi, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 3542.
- [60] S. Huhmann, A.K. Stegemann, K. Folmert, D. Klemczak, J. Moschner, M. Kube, B. Kokschi, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2017, **13**, 2869.
- [61] S. Tambaro, R. Reali, A. Volonterio, M. Zanda, F. Olimpieri, G. A. Pinna, P. Lazzari, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2013, **110**, 137.
- [62] F. Narjes, K.F. Koehler, U. Koch, B. Gerlach, S. Colarusso, C. Steinkuhler, M. Brunetti, S. Altamura, R. De Francesco, V.G. Matassa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, **12**, 701.
- [63] S. Di Marco, M. Rizzi, C. Volpari, M.A. Walsh, F. Narjes, S. Colarusso, R. De Francesco, V.G. Matassa, M.J. Sollazzo, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 7152.
- [64] U.I.M. Gerling, M. Salwiczek, C.D. Cadicamo, H. Erdbrink, S. Grage, P. Wadhvani, A. Ulrich, M. Behrends, G. Haufe, C. Czekelius, B. Kokschi, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 819.
- [65] K. Pagel, S.C. Wagner, R.R. Araghi, H. von Berlepsch, C. Böttcher, B. Kokschi, *Chem. - Eur. J.*, 2008, **14**, 11442.
- [66] C. Jäckel, M. Salwiczek, B. Kokschi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 4198.
- [67] M. Salwiczek, S. Samsonov, T. Vagt, E.K. Nyakatura, E. Fleige, J. Numata, M.T. Cölfen, B. Pisabarro, B. Kokschi, *Chem. - Eur. J.*, 2009, **15**, 7628.
- [68] M. Salwiczek, B. Kokschi, *ChemBioChem*, 2009, **10**, 2867.
- [69] V. Asante, J. Mortier, G. Wolber, B. Kokschi, *Amino Acids*, 2014, **46**, 2733.
- [70] D.D. Staas, K.L. Savage, V.L. Sherman, H.L. Shimp, T.A. Lyle, L.O. Tran, C.M. Wiscount, D.R. McMasters, P.E.J. Sanderson, P.D. Williams, B.J. Lucas Jr., J.A. Krueger, S.D. Lewis, R.B. White, S. Yu, B.K. Wong, C.J. Kochansky, M.R. Anari, Y. Yan, J.P. Vacca, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 6900.
- [71] C. Held, H. Hübner, R. Kling, Y.A. Nagel, H. Wennemers, P. Gmeiner, *ChemMedChem*, 2013, **8**, 772.
- [72] A. Testa, X. Lucas, G.V. Castro, K.H. Chan, J.E. Wright, A.C. Runcie, M.S. Gadd, W.T.A. Harrison, E.J. Ko, D. Fletcher, A. Ciulli, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 29, 9299.
- [73] B. Bilgiçer, A. Fichera, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 4393.
- [74] Y. Tang, G. Ghirlanda, W.A. Petka, T. Nakajima, W.F. DeGrado, D.A. Tirrell, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 1494.
- [75] K.H. Lee, H.Y. Lee, M.M. Slutsky, J.T. Anderson, E.N.G. Marsh, *Biochemistry*, 2004, **43**, 16277.
- [76] C. Renner, S. Alefelder, J.H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2001, **40**, 923.
- [77] L.K. Doerfel, I. Wohlgemuth, V. Kubyskin, A.L. Starosta, D.N. Wilson, N. Budisa, M.V. Rodnina, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 12997.
- [78] D.B. Berkowitz, M. Eggen, Q. Shen, R.K. Shoemaker, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 4666.
- [79] Y. Higashimoto, S. Saito, X.H. Tong, A. Hong, K. Sakaguchi, E. Appella, C.W. Anderson, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 23199.
- [80] R.J. Cox, A.T. Hadfield, M.B. Mayo-Martin, *Chem. Commun.*, 2001, 1710.

- [81] G. Liu, *Drugs Fut.*, 2004, **29**,1245.
- [82] T.R. Burke Jr., H.K. Kole, P.P. Roller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, **204**, 129.
- [83] T.R. Burke Jr., B. Ye, X. Yan, S. Wang, Z. Zia, L. Chen, Z.Y. Zhang, D. Barford, *Biochemistry*, 1996, **35**, 15989.
- [84] G. Boutselis, X. Yu, Z.Y. Zhang, R.F. Borch, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 856.
- [85] S. Zhang, L. Chen, Y. Luo, A. Gunawan, D.S. Lawrence, Z.Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**,13072.
- [86] V.P. Kukhar, H.R. Hudson (Ed.), *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.
- [87] P. Kafarski, B. Lejczak, *Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, 2001, **1**, 301.
- [88] J. Grembecka, P. Kafarski, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2001, **1**, 133.
- [89] F. Orsini, G. Sello, M. Sisti, *Curr. Med. Chem.*, 2010, **17**, 264.
- [90] P. Van der Veken, K. Senten, I. Kertész, A. Haemers, K. Augustyns, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 969.
- [91] B. Badet, D. Roise, C.T. Walsh, *Biochemistry*, 1984, **23**, 5188.
- [92] G.A. Flynn, D.W. Beight, E.H.W. Bohme, B.W. Metcalf, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 285.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 lutego 2020 r.