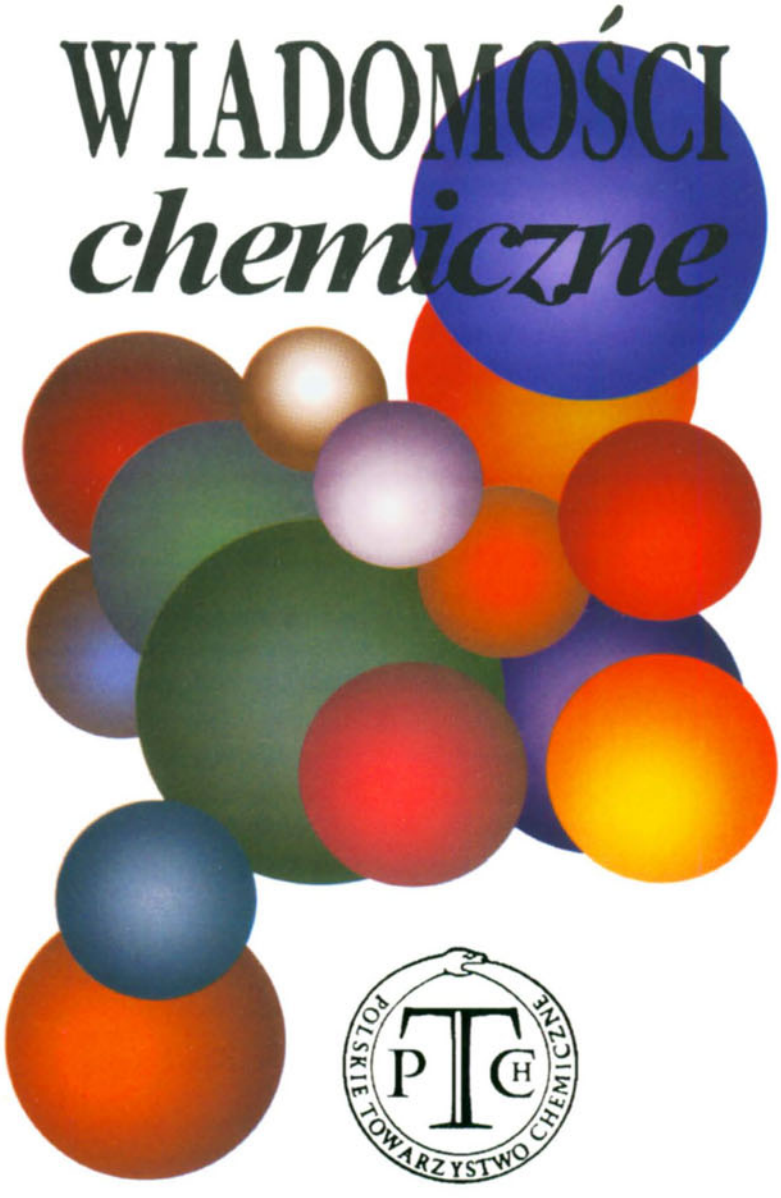
WIADOMOŚCI *chemiczne*



POLSKIE TOWARZYSTWO CHEMICZNE

CZASOPISMO
POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez KBN

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, JERZY BŁAŻEJOWSKI, JÓZEF CEYNOWA, SŁAWOMIR J. GRABOWSKI, HANNA GULIŃSKA, TADEUSZ M. KRYGOWSKI (PRZEWODNICZĄCY), ANDRZEJ KUTNER, JACEK MŁOCHOWSKI, JAN NAJBAR, JOLANTA NARKIEWICZ-MICHAŁEK, PIOTR PANETH, JERZY SUWIŃSKI, STANISŁAW WITKOWSKI

KOMITET REDAKCYJNY

BOGDAN BURCZYK, JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIERSKI, ADOLF KISZA, LUDWIK KOMOROWSKI, ZDZISŁAW LATAJKA, PRZEMYSŁAW MASTALERZ, IGNACY Z. SIEMION, MIROSŁAW SOROKA, MARIA SUSZYŃSKA

REDAKTOR NACZELNY

JÓZEF J. ZIÓŁKOWSKI

SEKRETARZ REDAKCJI

BARBARA LATKO

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: 071 375 73 89 lub 071 375 73 11, tel./fax: 071 322 14 06
e-mail: wchem@wchuwr.pl

INTERNET (English abstracts) http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm

„Wiadomości Chemiczne” są wydawane w ramach serii *Acta Universitatis Wratislaviensis*

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2007

ISSN 83-2292084-9

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w styczniu/lutym 2007

Przygotowanie do druku i druk:
Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa
tel.: 022 517 78 12, fax: 022 517 78 11, e-mail k2@druk-k2.pl

PROFESOR PIOTR SOBOTA
65-LECIE URODZIN

Trudno się oprzeć wrażeniu, że niekiedy kalendarz sobie z nas żartuje: za oknami świeci jesienne lub wiosenne słoneczko, a on twierdzi, że to styczeń. Gdy my, młodzi i pełni zapału, snujemy dalekosiężne plany, on uparcie nam przypomina, że przecież niedawno skończyliśmy 65 lat.

Tyle czasu podobno minęło od pewnego styczniowego dnia, gdy w 1942 roku w podgliwickich Przyszowicach urodził się nasz Kolega i Przyjaciel, obecnie już profesor Piotr Sobota.

Z maturalnym dyplomem w kieszeni, w 1961 r. zdecydował się opuścić śląskie wyżyny, by w dolnośląskiej stolicy rozpocząć studia na kierunku chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W 1966 roku, pod troskliwym okiem prof. dr hab. L. Sobczyka i prof. dr hab. K. Pigonia, obronił pracę magisterską dotyczącą oddziaływania amoniaku z chloranilem i zaraz potem, z entuzjazmem, wyruszył jeszcze dalej na Śląsk, do Głogowa, gdzie przez dwa lata nauczał chemii młodych adeptów wiedzy w tamtejszym liceum.

We wrześniu 1968 roku zdecydował się jednak powrócić do wrocławskiej *Alma Mater*, zdał wymagane egzaminy i trafił na studia doktoranckie w Instytucie Chemii, gdzie pod kierunkiem prof. dr hab. B. Jeżowskiej-Trzebiatowskiej rozpoczął badania naukowe nad wiązaniem i aktywacją cząsteczki diazotu.

Od 1 października 1970 roku, tym razem w roli starszego asystenta, znów zajął się nauczaniem. Kontynuując działalność naukową, w marcu 1973 roku napisał rozprawę doktorską pt. „Związki kompleksowe odwracalnie wiążące azot, ich struktura i własności" i otrzymał stopień naukowy doktora nauk chemicznych.

W roku 1978 Piotr habilitował się, a tytuł rozprawy habilitacyjnej brzmiał: „Aktywacja małych cząsteczek gazów przez związki metali przejściowych". W sierpniu 1978 roku wyjechał do Brighton (Anglia), gdzie na Uniwersytecie w Sussex odbył roczny staż naukowy pod kierunkiem światowej sławy uczonego prof. Josepha Chatta. W roku 1989 otrzymał tytuł naukowy profesora nauk chemicznych, a od 1993 roku jest profesorem zwyczajnym na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz kierownikiem: Zakładu Dydaktycznego Chemii dla Przyrodników i Zespołu Naukowego Aktywacji Małych Cząsteczek i Kinetyki.

W początkowym okresie pracy na Uniwersytecie Wrocławskim przedmiotem zainteresowań naukowych prof. P. Soboty były reakcje aktywacji cząsteczki azotu przez związki kompleksowe żelaza i tytanu. Inne badania doprowadziły do wyjaśnienia mechanizmu reakcji redukcji związków pierwiastków przejściowych metalicznym magnezem w tetrahydrofuranie oraz do ustalenia korelacji między strukturą elektronową pierwiastka przejściowego a jego reaktywnością w procesie wiązania i aktywacji takich cząsteczek, jak diazot, diwodor, ditlenek węgla, tlenek węgla itp.

Najważniejsze osiągnięcia prowadzonych w tym okresie badań to:

- odkrycie pierwszej homogenicznej reakcji katalitycznej syntezy wodorku magnezu mogącego służyć jako „magazyn" gazowego wodoru,
- odkrycie nowej reakcji redukcji azotu molekularnego do amoniaku i hydrazyny,
- odkrycie reakcji redukcji tlenku węgla do metanu i acetylenu,
- zbadanie mechanizmu i opracowanie nowej metody syntezy mrówczanów bezpośrednio z CO_2 i H_2,
- wyjaśnienie stereospecyficznego mechanizmu reakcji tworzenia się wiązania węgiel–węgiel pomiędzy cząsteczkami ketonów w obecności związków Ti^{3+}.

Przeglądając dorobek naukowy z tego okresu, nie sposób pominąć badań nad reaktywnością tlenku węgla, które doprowadziły do opracowania nowej jednostopniowej reakcji syntezy karbonylków: chromu, molibdenu i wolframu w warunkach normalnych. Metody otrzymywania karbonylków zostały opatentowane. Kolejne poszukiwania nowych reakcji, pozwalających syntezować związki chemiczne zawierające wiązanie azot–węgiel bezpośrednio z diazotu, umożliwiły po raz pierwszy zsyntezować dimetyloacetamid z N_2 i CO oraz izocyjanian. Do niezwykle cennych osiągnięć należy również zaliczyć badania układów modelowych nitrogenazy wiążących cząsteczkę diazotu.

Kontynuując prowadzone wcześniej prace, prof. Sobota rozpoczął badania w nowej dziedzinie: nad wpływem tetrahydrofuranu oraz dichlorku magnezu na proces aktywacji małych cząsteczek. Stwierdził, że tetrahydofuran podczas reakcji redukcji związków pierwiastków przejściowych magnezem, spełnia nie tylko rolę rozpuszczalnika, ale także ważnego reagenta.

Na szczególną uwagę zasługuje odkrycie przez niego dużej reaktywności dichlorku magnezu. Piotr otrzymał kilkadziesiąt nowych heterobimetalicznych związ-

ków, zbadał ich właściwości magnetyczne i spektroskopowe; dla większości z nich określając struktury metodą rentgenograficzną. Dzięki temu możliwe było wyjaśnienie oddziaływań pomiędzy kwasowymi centrami metali, rozpuszczalnikiem i aktywowaną cząsteczką. Niektóre z otrzymanych związków np. tytanowo-magnezowe są najlepszymi stosowanymi obecnie katalizatorami polimeryzacji olefin. Warto dodać, że otrzymany po raz pierwszy w czystej postaci związek o budowie $[Mg_2(\mu\text{-}Cl)_3(THF)_6][TiCl_5(THF)]$ razem z kokatalizatorem używany jest obecnie przez firmę The Dow Company w USA do produkcji polietylenu.

Systematyczne badania katalizatorów polimeryzacji olefin doprowadziły do otrzymania szeregu nowych związków tytanu, cyrkonu, magnezu i glinu z estrami alifatycznymi i aromatycznymi. W wyniku tego zostały wyznaczone parametry określające położenie atomu tytanu, magnezu i glinu w stosunku do płaskiej grupy estrowej oraz znalezione zostały zależności pomiędzy aktywnością katalityczną i stereospecyficznością procesu polimeryzacji propylenu.

Ostatnie lata badań Piotra związane są z alkoksy związkami metali w syntezie nowych materiałów. Ze względu na różnorodność ich właściwości determinujących wszechstronne zastosowanie, np. wykorzystanie jako katalizatorów i inicjatorów ważnych procesów przemysłowych, m.in. polimeryzacji olefin i naturalnych estrów cyklicznych, ale również do wytwarzania czystych polimetalicznych tlenków metali, a więc do produkcji nowych materiałów i włókien ceramicznych. Wybór tematyki okazał się zatem trafny.

Kolejnym, niezwykle ważnym tematem, którym ostatnio zajmuje się Piotr, to badania nad syntezą biodegradowalnych, przyjaznych środowisku biopolimerów. Szczególnie interesującym, nowo otrzymanym biopolimerem okazał się poli-L-laktyd (PLA) i jego kopolimery z laktonami i glikolami. Opracowane w zespole kierownym przez Piotra metody syntezy biodegradowalnych polimerów w procesie polimeryzacji cyklicznych estrów z otwarciem pierścienia (ROP) są bardzo użyteczne, a zastosowanie dodatkowo ligandów chiralnych umożliwiło syntezę z mieszanin racemicznych polimerów izotaktycznych.

Prof. Piotr Sobota jest uznanym i cenionym specjalistą w dziedzinie chemii koordynacyjnej i metaloorganicznej, współpracuje z wieloma zagranicznymi ośrodkami naukowymi m.in.: Nitrogen Fixation Laboratory, John Innes Centre, Norwich (Anglia), Centro de Quimica Estrutural, Complexo Instituto Superior Técnico, Lizbona (Portugalia), University of Iowa, The Ohio State University (USA), University of Ottawa, Toronto (Kanada), University of Heidelberg, Dortmund, Erlangen-Nürnberg (Niemcy), Kiev University (Ukraina).

Jest autorem lub współautorem **162** oryginalnych prac naukowych, publikowanych głównie w takich w czasopismach jak: *Inorganic Chemistry*, *Organometallics*, *Chemistry – A European Journal*, *Coordination Chemistry Reviews*, *Journal of Chemical Society Dalton Transaction*, *Chemical Communication*, *Journal of Organometallic Chemistry* oraz **252** komunikatów i referatów zwykle publikowanych w „*proceeding of international conferences*". Jest współautorem rozdziałów

w **6** książkach, **5-ciu** patentów oraz współwydawcą dwóch zeszytów w czasopiśmie *New Journal of Chemistry*. W latach 1990–2006 kierował łącznie **14** grantami KBN, w tym **2** zamawianymi, **7** promotorskimi oraz został wyróżniony przyznaniem grantu przez Fundację Nauki Polskiej MILAB (2005). Z ramienia Uniwersytetu Wrocławskiego w latach 2003–2005 był koordynatorem międzynarodowego grantu FP-6-2004 Mobility-13 „*Structuring the European Research Area*".

Wyniki swoich prac przedstawił na licznych konferencjach naukowych w Polsce, krajowych i międzynarodowych i wielu uniwersytetach w Europie i USA oraz na zaproszenie Komitetów Organizacyjnych międzynarodowych najbardziej prestiżowych konferencji m.in.: American Chemical Society, The Royal Chemical Society, International Conference of Coordination Chemistry, International Conference on Organometallic Chemistry. Wygłosił łącznie **105** wykładów na temat chemii koordynacyjnej, organometalicznej, bionieorganicznej.

Dowodem uznania dla Jego osiągnięć było powołanie do Komitetu Redakcyjnego *New Journal Chemistry* (w 1997 r.) oraz na konsultanta naukowego *The Dow Chemical Company*, USA (od 1998 r.) oraz firmy farmaceutycznej HASCO-Lek, Polska (od 2005 r.).

Profesor Piotr Sobota jest członkiem dwóch Komisji PAN, Polskiego Klubu Katalizy oraz, od 1997 r., jest członkiem Zespołu Specjalistycznego T09A d/s oceny wniosków o finansowanie projektów badawczych KBN, MEiN i ostatnio Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Brał udział przy ocenie i klasyfikacji jednostek badawczych oraz w pracach Komisji Komitetu PAN – przygotował raport pt.: „Stan nauki polskiej w obszarze chemii".

Na szczególne uznanie zasługuje działalność organizacyjna Piotra. Jest współorganizatorem Międzynarodowych Letnich Szkół Chemii Koordynacyjnej (Karpacz, Polanica: 1993, 1996, 1999, 2004) oraz organizatorem Międzynarodowego Seminarium dla Doktorantów (Polanica: 1997, Karpacz 2000, Szklarska Poręba 2005).

Poziom tych spotkań oraz panująca tam atmosfera pozostają w pamięci uczestników na długie lata, czego dowodem jest chociażby wspomnienie o Piotrze wybitnego propagatora chemii, prof. Freda Basolo, zamieszczone w jego beletryzującej autobiografii.

Jako członek Senatu Uniwersytetu Wrocławskiego, w latach 2003–2005, prof. Piotr Sobota przewodniczył Senackiej Komisji Nauki i Współpracy z Zagranicą UWr.

Za osiągnięcia naukowe, dydaktyczne i organizacyjne był wielokrotnie wyróżniany, m.in. nagrodami MSzWiT, MEN, The Royal Society of Chemistry Journal Grants of International Authors oraz nagrodami Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego, indywidualnymi i zespołowymi. Od początku kieruje zespołem naukowym Aktywacji Małych Cząsteczek i Kinetyki, który osiąga bardzo dobre wyniki, liczące się w kraju i na świecie. Jest promotorem **11** prac doktorskich (2 dalsze w toku), dwóch doktorów uzyskało stopień doktora habilitowanego, pod Jego kierunkiem wykonano **77** prac magisterskich.

Szanowny Jubilacie, liczymy, że ta lista dokonań, liczb, tytułów i nagród będzie się jeszcze długo rozrastać, że przy następnych okazjach znów będziemy mogli napisać o Twoich kolejnych sukcesach, a dziś – co oczywiste – życzymy Ci mnóstwa satysfakcji, sił i niezawodnego zdrowia.

Koleżanki, Koledzy, Przyjaciele
z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 1-2
PL ISSN 0043-5104

LEKI PRZECIW GRYPIE. SYNTEZA TAMIFLU® – LEKU GROMADZONEGO, ABY ZAPOBIEC EPIDEMII PTASIEJ GRYPY

ANTI-VIRUS DRUGS. SYNTHESIS OF TAMIFLU® – A DRUG CHOSEN TO PREVENT THE AVIAN FLU EPIDEMIC

Michał Karchier, Karol Michalak, Jerzy Wicha

Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Kasprzaka 44/56, 01-224 Warszawa

Abstract
Wstęp
1. Kwasy sialowe i ich funkcje w infekcjach grypowych
2. Poszukiwania leków przeciw grypie
3. Karbocykliczne pochodne kwasu neuroaminowego
4. Synteza karbocyklicznych analogów Gilead-Roche pierwszej generacji. Rozwój badań nad Tamiflu®
5. Syntezy Tamiflu® z kwasów (–)-chinowego i (–)-szikimowego
6. Surowce do produkcji Tamiflu®. Otrzymywanie kwasów (–)-chinowego i (–)-szikimowego z użyciem genetycznie modyfikowanego szczepu *Escherichia coli*
7. Syntezy totalne
Uwagi końcowe
Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Michał Karchier (ur. 1982) ukończył Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej w 2005 r. Obecnie wykonuje pracę doktorską w Instytucie Chemii Organicznej PAN pod kierunkiem prof. Jerzego Wichy.

Dr Karol Michalak (ur. 1968 r.) ukończył Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w 1992 r. Stopień doktorski uzyskał w 1998 roku w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie. Po stażu podoktorskim na Uniwersytecie w Calgary (Kanada) kontynuuje pracę w IChO PAN.

Prof. dr Jerzy Wicha studia odbył w uniwersytetach w Odessie i w Moskwie. Stopień magisterski uzyskał w 1958 r., doktorski w 1964 r. (Uniwersytet Warszawski) a habilitację uzyskał w 1970 r. (Uniwersytet Warszawski). Od 1970 r. pracuje w Instytucie Chemii Organicznej PAN na stanowisku docenta a następnie profesora (od 1979 r.). Specjalność: chemia produktów naturalnych, synteza totalna, metody syntezy.

ABSTRACT

Influenza (flu) and related viral infections present a constant threat to public health. World-wide efforts have been recently initiated (coordinated by WHO) to prevent global epidemic in view of spreading deadly bird flu virus (H5N1) among people [1, 6]. Attention has been focused on Tamiflu® (**1**, Figure 1), synthetic, orally active drug manufactured by Hoffmann – La Roche [12].

On the surface of the flu virus (Figure 3) there are located two proteins important for infecting animal cell: hemagglutinin and neuraminidase (sialidase). Hemagglutinin is responsible for the recognition of specific sialic acids in the cell membrane glycoconjugates; neuraminidase is involved in subsequent hydrolysis of sialic acid residue and is crucial for the virus propagation. Sialic acids are sugar-related keto-acids, as neuraminic acid **2** (Figure 2). Their structure is specific for a given species. Functions of hemagglutinin or neuraminidase have been targeted in systematic search for anti-flu drugs.

The first efficient neuraminidase competitive inhibitor Relanza® (Zanamivir) has been obtained (Scheme 2) as a mimic of hypothetic oxonium ion involved in sialic acid hydrolysis [11, 15]. Many structures related to Zanamivir have been investigated [19]. The most successful line of research has been aimed at synthesis of carbocyclic neuraminic acid derivatives from (–)-quinic or (–)-shikimic acids.

The Gilead-Roche „first generation" analogue with the double bond oriented toward the hydroxy-group **33** proved more active than its counterpart **34** (Figure 9, Scheme 9) [26, 27]. Further modification of the structure **33** was based on X-ray analysis of protein – inhibitor complexes and led to Tamiflu® (Scheme 10).

Prime synthesis of Tamiflu® from (–)-shikimic acid involved several steps (Schemes 5, 6, 10). Since this starting material is rather expensive more economic approaches have been studied. The technological approach to the key epoxide **75** from (–)-quinic acid (Scheme 12) involves bicyclic lactone **70** controlled dehydration to form **73** and regiospecific acetal reduction using borane-dimethylsulfide complex in the presence of a silylating agent [31]. Use of the developed methods and shikimic acid as the starting material allowed for an efficient access to the target epoxide **75** (Scheme 13).

The epoxide **75** has been transformed into the final product in several steps (Scheme 14).

Most advanced synthetic routes transforming **75** into Tamiflu® rely upon the use of *tert*-butylamine and then diallylamine [11, 33] (Scheme 15).

Current studies on transformation of glucose into shikimic acid by genetically modified strain of *Escherichia coli* (Scheme 16) are likely to secure supplies of this convenient starting material for Tamiflu® production [37].

E.J. Corey et al. [40] have developed enantioselective total synthesis of Tamiflu®. [2+4] cycloaddition reaction of butadiene and trifluoroethylacrylate in the presence of a chiral oxazoborolidine catalyst provided cyclohex-3-enecarboxylic acid derivative (**87**, Scheme 19). Transformation of **87** into **99** embraced several steps, including the novel haloamidation [41] (**86** into **97**). The synthesis route involved 12 steps and afforded Tamiflu® in 25% overall yield.

Catalytic enantioselective reaction of the easily accessible *meso*-aziridine **101** (Scheme 21) with trimethylsilylazide provided the cornerstone to total synthesis of Tamiflu® by M. Shibasaki et al. [48]. The synthetic route from azide 102 to the target involved several steps (Schemes 23 and 24). Among them the efficient allylic oxidation of 109 and the nickel-catalyzed conjugate addition of trimethylsilylcyanide to α,β-unsaturated ketone 110 that contribute to general synthetic methodology.

In the synthesis developed by Cong i Yao [51], the starting material – serine-derived aldehyde **117** (Garner's aldehyde, Scheme 25) has been selected from the „chiral pool". The synthesis involves a sequence of diastereoselective reactions (Schemes 25, 26 and 27) and the ring-closure metathesis reaction (**130** into **131**) using the II generation Grubbs catalyst.

Approaches to Tamiflu® illustrate the impressive achievements of organic synthesis. However, at present the high cost of this drug may hamper its broader application.

Keywords: synthetic methods, enantioselective synthesis, quinic acid, shikimic acid, antiviral agents, structure–activity relationship

Słowa kluczowe: metody syntezy, synteza enancjoselektywna, kwas chinowy, kwas szikimowy, czynniki przeciwwirusowe, zależność struktura–aktywność

WSTĘP

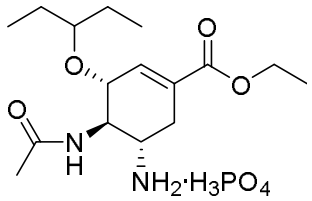
Mniej lub bardziej złośliwe odmiany grypy pojawiają się każdej jesieni. Oprócz zwykłych uciążliwości tej wirusowej choroby, w społecznej pamięci utrwaliły się groźne epidemie: w latach 1918–1920 „hiszpanka", 500 milionów zachorowań, co najmniej 40 milionów ze skutkiem śmiertelnym (wirus H1N1), 1957–1958 „grypa azjatycka" 1 do 1,5 miliona przypadków śmiertelnych (wirus H2N2), 1968–1969 grypa z Hong Kongu, 750 tys. do 1 miliona zgonów (wirus H3N2). Hiszpanka w stosunkowo krótkim okresie pochłonęła więcej ofiar niż wszystkie fronty pierwszej wojny światowej. Od 1968 r. nie odnotowano poważnej epidemii. Tym niemniej, według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), grypa jest corocznie przyczyną dwustu pięćdziesięciu tysięcy do pół miliona zgonów i ogromnych strat materialnych. Tylko w Stanach Zjednoczonych straty z tytułu wydatków na służbę zdrowia i zmniejszonej produktywności, szacuje się na 12 miliardów dolarów [1–4].

Grypę wywołuje wirus *Orthomyxoviridae* występujący w trzech odmianach: A, B i C, przy czym ta ostatnia jest uważana za niegroźną. Infekcje wirusowe obejmują wiele gatunków kręgowców, m.in. ptaki, świnie, konie, psy, itp. Przypuszcza się [5], że naturalnym rezerwuarem wirusa grypy jest dzikie ptactwo wodne. Stąd w drodze zarażeń międzygatunkowych, obejmujących zwierzęta domowe (głównie kaczki i świnie), wytwarzają się nowe mutanty zdolne do infekowania człowieka.

Działania zapobiegające epidemiom grypy koordynuje WHO. Raz w roku (właściwie dwa razy – raz dla półkuli północnej i raz dla południowej) przygotowywane są szczepionki zawierające osłabione lub wręcz martwe szczepy wirusa, które według przewidywań zaatakują w danym roku. Ze względu na wysoką zdolność wirusów do mutacji przewidywania niekiedy zawodzą, a na przygotowanie milionów dawek nowej formuły potrzeba obecnie około pół roku.

O narastającym w ostatnich latach zagrożeniu epidemią „ptasiej" grypy (wirus H5N1) alarmują media. Ciągle wzrasta liczba zarażeń mutantami wirusa H5N1, a według doniesień BBC (początek sierpnia 2006 r.), od 2003 r. ponad 130 osób zmarło z powodu zarażenia ptasią grypą, głównie w Azji południowo-wschodniej, ale również w Afryce i Europie. Potęgują się straty w hodowlach drobiu spowodowane selekcjami koniecznymi dla ograniczenia rozprzestrzeniania się choroby.

Zapobieganie epidemii stało się problemem społecznym i politycznym. Czasopismo Science [6] donosi o spotkaniu w Genewie zorganizowanym przez WHO z udziałem dyplomatów i ekspertów od ochrony zdrowia z 110 krajów, przedstawicieli organizacji humanitarnych, Banku Światowego i innych organizacji finansowych. Tematem obrad była strategia ochrony przed globalną epidemią oraz ograniczenie strat w hodowlach drobiu. Podjęto decyzję o gromadzeniu zapasów wybranego leku zapobiegającego i przeciwdziałającego grypie – Tamiflu® (fosforan Oseltamiviru, **1**, Rys. 1) oraz o zwiększeniu produkcji szczepionek.



1

Rysunek 1. Tamiflu® (fosforan Oseltamiviru)

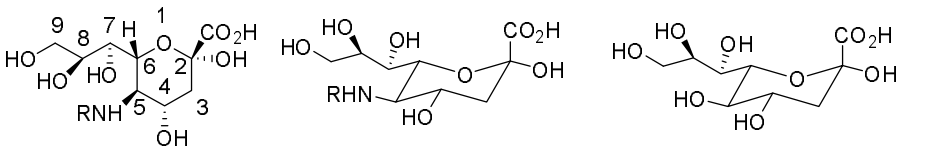
Tamiflu®, wytwarzany przez firmę Hoffmann La Roche, jest przeznaczony do stosowania doustnego, hamuje gwałtowny rozwój obydwu form wirusa (A i B), co umożliwia skuteczne uruchomienie systemu immunologicznego zainfekowanego organizmu (stosowanie powinno być podjęte w ciągu dwu dni od wystąpienia objawów). Substancją czynną jest optycznie aktywny, wielofunkcyjny związek syntetyczny o właściwościach zasadowych – Oseltamivir.

Niżej przedstawiamy zarys historii odkrycia Tamiflu® na tle innych leków przeciwwirusowych oraz metody syntezy tego związku.

1. KWASY SIALOWE I ICH FUNKCJE W INFEKCJACH GRYPOWYCH [5]

KWASY SIALOWE

Rodzina cukrowych α-keto kwasów, pochodnych kwasu neuroaminowego (**2**, Rys. 2) o dziewięciu atomach węgla w podstawowym szkielecie, nosi ogólną nazwę kwasów sialowych [7]. Zidentyfikowano około 50 związków tej grupy występujących w organizmach kręgowców, wyższych bezkręgowców oraz pewnych typach bakterii. Podstawowe struktury kwasów sialowych przedstawiono na Rysunku 2.



2, R = H, Kwas neuroaminowy (Neu)
3, R = Ac, Kwas *N*-acetyloneuroaminowy (Neu5Ac)

4 Kwas 2-keto-3-deoksy-*D-glycero-D-galacto*-nonulosowy

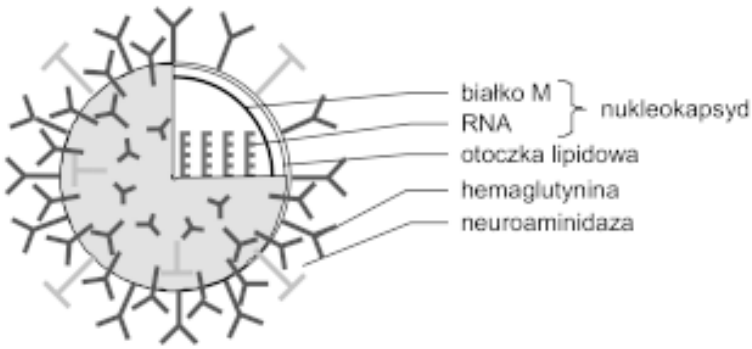
Rysunek 2. Podstawowe struktury kwasów sialowych

Kwasy sialowe są wbudowane w łańcuch oligosacharydowy glikoprotein i glikolipidów (glikokoniugatów), przeważnie w pozycji terminalnej. Te strukturalne jednostki są specyficzne dla gatunku, w którym występują.

BIAŁKA ODDZIAŁYWUJĄCE Z KWASAMI SIALOWYMI

Na powierzchni wirusa ulokowane są dwa typy białka specyficznie oddziaływujące z kwasami sialowymi: hemaglutinina (lektyna) oraz neuroaminidaza (glikohydrolaza) (Rys. 3). Hemaglutinina to homotrimeryczne białko rozpoznające kwasy sialowe. Wiązanie tego białka z glikokoniugatami inicjuje endocytozę – wchłanianie wirusa przez komórkę gospodarza. Neuroaminidaza (zwana również sialidazą) jest homotetramerycznym białkiem [8, 9], powodującym hydrolityczne odcięcie kwasu sialowego od glikoproteiny. Biologiczne konsekwencje tej czynności nie są dokładnie poznane. Przypuszcza się, że ma ona związek z uwalnianiem wirusów potomnych z zainfekowanej komórki. Może także wspomagać transport wirusa w śluzie dróg oddechowych.

W cyklu mutacji wirusa grypy następują modyfikacje obydwu tych białek i ich dostosowanie do rozpoznania i oddziaływania z kwasami sialowymi nowych gatunków gospodarza (typy hemaglutininy H i neuroaminidazy N są używane w nazwach mutantów wirusa, np. H5N1). Dostosowanie może odbywać się również na drodze rekombinacji materiału genetycznego następującej podczas zainfekowania tej samej komórki różnymi typami wirusa.



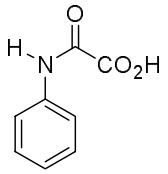
Rysunek 3. Zarys struktury wirusa grypy

Główny nurt systematycznych poszukiwań leków przeciwwirusowych został ukierunkowany na hamowanie działania hemaglutininy lub neuroaminidazy.

2. POSZUKIWANIA LEKÓW PRZECIW GRYPIE

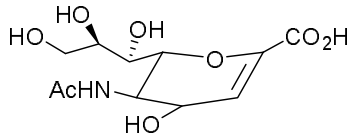
W latach 60. odkryto, że kwas *N*-fenylo oksaminowy (**5**, Schemat 1) i jego estry są inhibitorami kompetycyjnymi neuroaminidazy wirusa grypy [10] (stała inhibicji K_i rzędu 10^{-4} M). Jednakże skrining losowo wybranych związków nie naprowadził na właściwy trop.

We wczesnych badaniach systematycznych [11, 12] podjęto próby znalezienia inhibitora neuroaminidazy, który miałby cechy strukturalne stanu przejściowego w reakcji z udziałem tego enzymu. Założono, że hydroliza terminalnej jednostki sialilowej przebiega poprzez jon oksoniowy ze spłaszczonym (sp^2) atomem węgla C2 (Schemat 1). Jednym z pierwszych opisanych inhibitorów neuroaminidazy był kwas 2-deoksy-2,3-didehydro-D-*N*-acetyloneuroaminowy (Neu5Ac2en, **6**, Schemat 1).



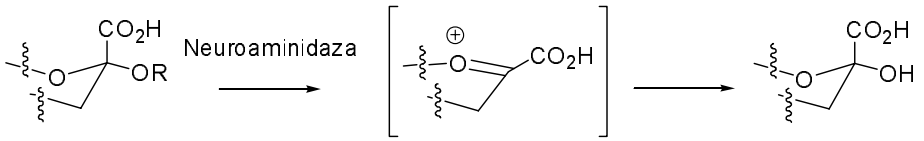
5

Kwas *N*-fenylo oksaminowy
K_i 10^{-4}



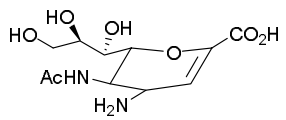
6

Kwas 2-deoksy-2,3-didehydro-D-*N*-acetyloneuroaminowy (Neu5Ac2en)
K_i 10^{-6} M



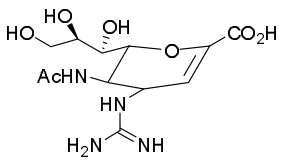
Schemat 1

Rentgenograficzne ustalenie struktur [13, 14] kompleksów neuroaminidazy wirusów grypy z Neu5Ac (**3**) oraz z Neu5Ac2en (**6**) miało kluczowe znaczenie dla dalszych badań (1992–1993; strukturę samej neuroaminidazy poznano wcześniej [8, 9]). Stwierdzono, że zaabsorbowanie jednostek kwasów sialowych nie zmienia geometrii centrum aktywnego. Analiza kompleksu z pomocą metod obliczeniowych pozwoliła utworzyć mapy oddziaływań i przewidywać modyfikacje kwasu neuroaminowego o silnym powinowactwie do enzymu, a tym samym projektować „racjonalne" inhibitory [11, 15].



7

Pochodna aminowa kwasu neuroaminowego

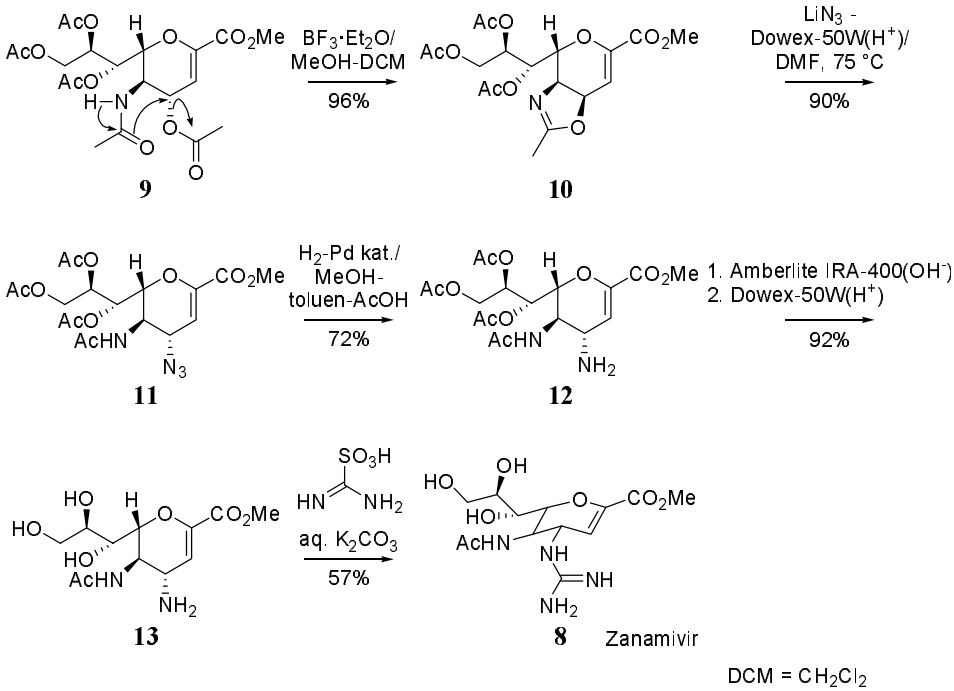


8

Pochodna guanidynowa, Zanamivir, K_i 10^{-11}M

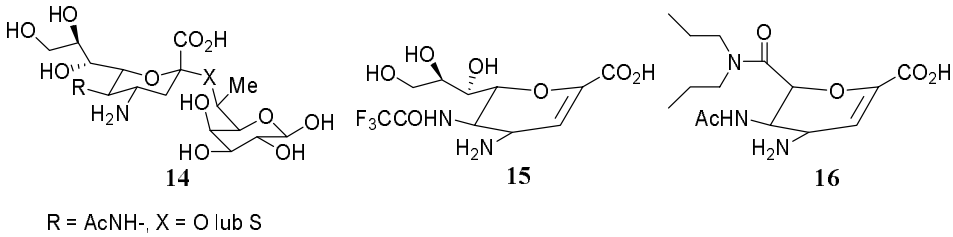
Rysunek 4. Pochodna aminowa i guanidynowa kwasu 2-deoksy-2,3-didehydro-D-*N*-acetyloneuroaminowego

Na tej zasadzie syntetyzowano [16–18] pochodną aminową (**7**, Rys. 4), która charakteryzowała się dwukrotnie wyższym współczynnikiem inhibicji od Neu5Ac2en (**6**) oraz wysoce aktywną pochodną guanidynową – Zanamivir (**8**) (K_i 10^{-11} M). Zanamivir w równym stopniu hamuje wirusy A i B. Został on wprowadzony do lecznictwa pod nazwą Relenza® przez firmę GlaxoSmithKline i jest podawany bezpośrednio do płuc w inhalacjach (*spray*, 2 razy dziennie).



Schemat 2

Syntezę Zanamiviru przedstawiono na Schemacie 2. Reakcja pochodnej kwasu neuroaminowego **9** [16, 17] z eteratem trifluorku boru w chlorku metylenu, zawierającym niewielką ilość metanolu, prowadziła do eliminacji kwasu octowego kosztem grupy acyloksylowej w pozycji allilowej oraz protonu ugrupowania acetamidowego. Uzyskano wysoko reaktywną pochodną oksazolu **10**, którą traktowano azydkiem litu w DMF wobec kwaśnej żywicy Dowex50W. Nastąpiło przyłączenie grupy azydkowej w pozycję 4 i przywrócenie ugrupowania acetamidowego. Redukcja azydku **11** wodorem wobec palladu na węglu aktywnym dała aminę **12**. Na tym etapie usunięto zabezpieczające grupy octanowe, działając najpierw żywicą alkaliczną Amberlite IRA400, a następnie – Dowex50W. Ugrupowanie guanidynowe uzyskano działając na aminę **13** kwasem aminoiminosulfonowym w wodnym roztworze węglanu potasu.

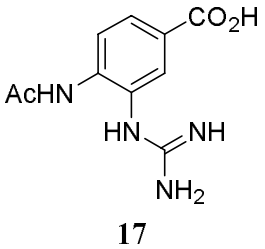


Rysunek 5. Wybrane analogi Neu5Ac badane jako inhibitory neuroamidazy

Oprócz Zanamiviru, syntetyzowano i zbadano znaczną liczbę strukturalnych modyfikacji kwasu Neu5Ac (**3**). Prace te zreferowano w licznych artykułach monograficznych [19]. Dla potrzeb obecnego omówienia zwrócimy uwagę zaledwie na kilka wybranych przez nas struktur (Rys. 5).

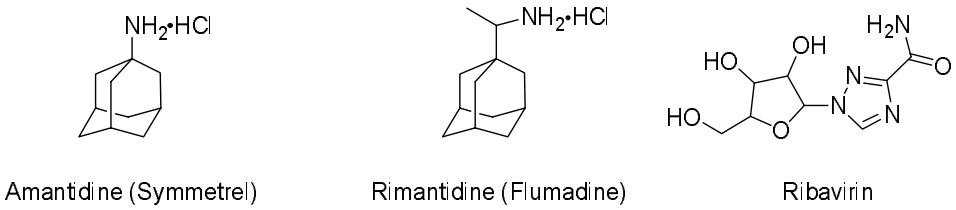
Sialozydy typu **14** w określonej konformacji wiążą się z neuroaminidazą. Nie wykazały jednak znaczącego wzrostu hamowania enzymu, w porównaniu ze związkiem macierzystym [20]. Prosta modyfikacja [21] Neu5Ac2en (**6**), polegająca na zastąpieniu reszty acylowej trifluoroacylową (związek **15**, Rys. 5), spowodowała zwiększenie inhibicji *in vitro*, ale nie *in vivo*. Interesujące właściwości wykazały pochodne zsyntetyzowane w firmie Glaxo Welcome [22], w których glicerynowy łańcuch boczny zastąpiono grupą dialkiloamidową. Na przykład związek **16** (Rys. 5) wykazuje aktywność porównywalną do Zanamiviru, aczkolwiek z nieco gorszymi efektami *in vivo*.

Oddzielną grupę inhibitorów neuroaminidazy stanowią pochodne kwasu benzoesowego. Strukturę jednego z najbardziej aktywnych *in vitro* związków tej grupy [23] **17** (o czynności zbliżonej do Neu5Ac2en, **6**) przedstawia Rysunek 6. Rentgenostrukturalne badania kompleksu **17** z neuroaminidazą wykazały nieoczekiwanie, że to grupa guanidynowa wiąże się z centrum zajmowanym w przypadku Neu5Ac2en (**6**) przez łańcuch glicerynowy. Badania ponad stu pochodnych kwasu benzoesowego nie doprowadziły do pochodnej aktywnej *in vivo* (testy na myszach), jak się przypuszcza ze względu na szybki metabolizm.



Rysunek 6. Pochodna kwasu benzoesowego aktywna jako inhibitor neuroaminidazy

W zakończeniu tego przeglądu struktur należy wspomnieć o pochodnych adamantanu, Amantidine i Rimantidine (Rys. 7). Leki te działają na innej zasadzie. Ich funkcja polega na hamowaniu pompy protonowej, co zapobiega wzrostowi wewnętrznego pH i dezintegracji zaatakowanej przez wirusa komórki.

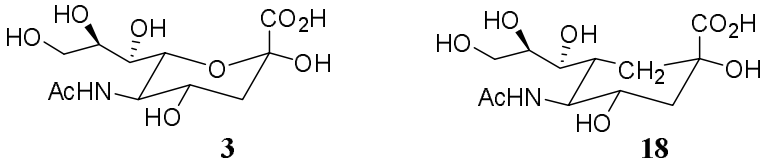


Rysunek 7. Leki przeciw grypie nie będące pochodnymi kwasów sialowych

Warte odnotowania są: Ribavirina i Palivizumab, dwa leki przeciw syncytialnemu wirusowi oddechowemu (ang. *respiratory syncytial virus*, RSV) – głównej infekcji dolnych dróg oddechowych u dzieci, stosowane w USA [1]. Ribavirina jest analogiem purynowego nukleozydu. Palivizumab może być traktowany jako pogranicze szczepionki i leku, gdyż jest to genetycznie modyfikowane przeciwciało specyficzne dla pewnych białek RSV (działa krótkoterminowo, podobnie jak przeciwciała przekazywane niemowlętom w mleku matki).

3. KARBOCYKLICZNE POCHODNE KWASU NEUROAMINOWEGO.

Pierwszą karbocykliczną pochodną kwasu *N*-acetyloneuroaminowego opisali chemicy japońscy [24] (**18**, Rys. 8). Związek ten został otrzymany (jako racemat) w ponad dwudziestoetapowej syntezie. Wstępne badania wykazały jedynie słabe działanie hamujące **18** wobec wybranych neuroaminidaz.

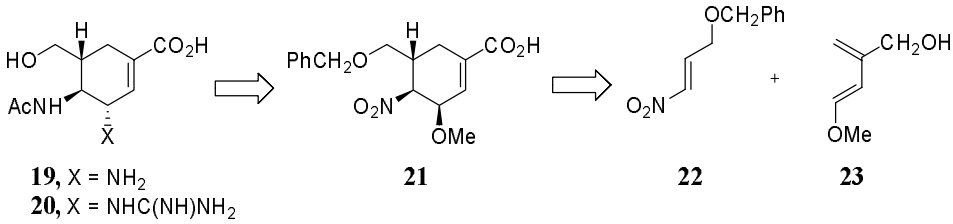


Rysunek 8. Kwas *N*-acetyloneuraminowy i jego pierwszy analog karbocykliczny

Badacze z firmy Glaxo [25] skoncentrowali się na syntezie uproszczonych pochodnych karbocyklicznych kwasu *N*-acetyloneuroaminowego **19** i **20** (Schemat 3). Struktury zostały wybrane tak, aby odpowiadały wymaganiom ustalonym w trakcie prac nad Zanamivirem i jednocześnie nie nastręczały trudności w syntezie. Mianowicie, w pozycji 2 znajduje się wiązanie podwójne, a w pozycji 4 grupa aminowa lub guanidynowa. Glicerynowy łańcuch boczny został zastąpiony grupą hydroksy-

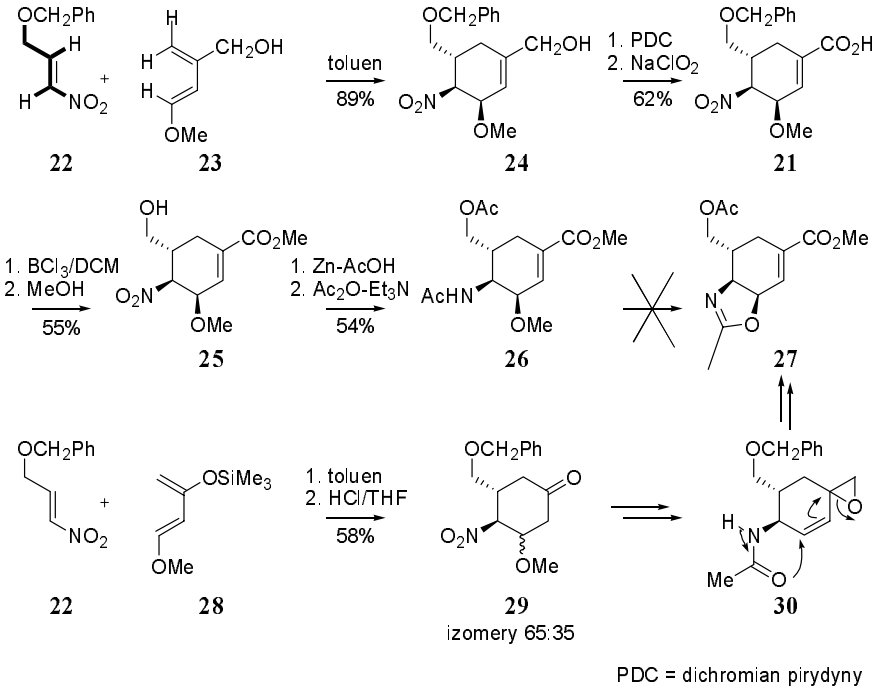
metylenową, zgodnie z ustaleniami, że modyfikacje tego typu nie mają decydującego wpływu na zakres czynności. Takie przybliżenia doprowadziły do wybrania jako substancji wyjściowych dienofila **22** i dienu **23**.

Należy podkreślić, że podjęto syntezę związków racemicznych. Biologiczne właściwości enancjomerów naturalnych kwasów sialowych nie zostały dotąd opisane.



Schemat 3

Reakcja Dielsa-Aldera (Schemat 4) bardzo aktywnego dienofila **22** i dienu **23** przebiegała w temperaturze pokojowej. Zgodnie z oczekiwaniem, utworzył się tylko jeden regioizomer (względne usytuowanie dienu i dienofila zaznaczono na schemacie) i głównie jeden diastereomer **24** (z egzo orientacją grupy nitrowej).



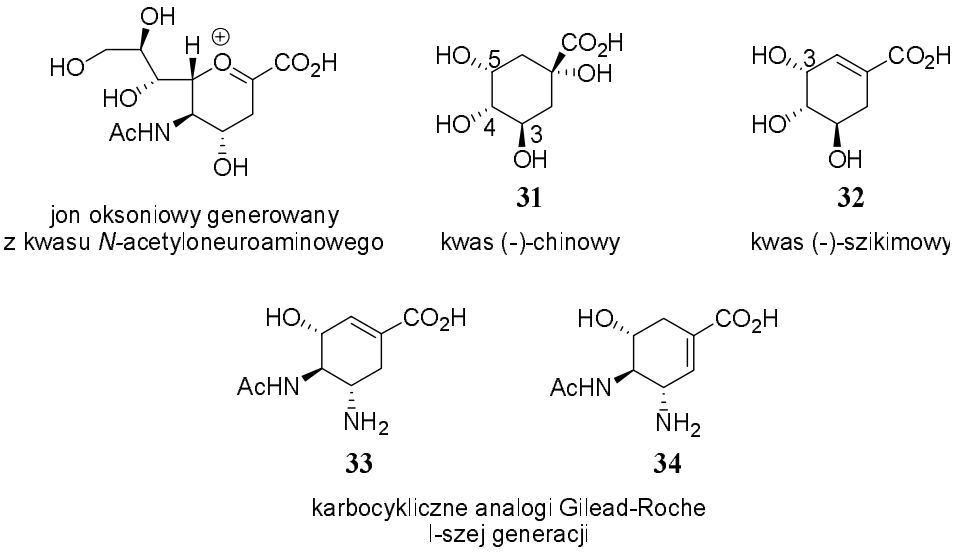
Schemat 4

Grupę metylenohydroksylową w addukcie **24** utleniono w dwóch etapach do grupy karboksylowej. Produkt utlenienia **21** traktowano trichlorkiem boru, a następnie metanolem. W tych warunkach usunięto zabezpieczającą grupę benzylową oraz uzyskano estryfikację grupy karboksylowej. W związku **25** grupę nitrową zredukowano do aminowej (cynk w kwasie octowym, reakcję wspomagano ultradźwiękami) i amino-alkohol zacetylowano. Kluczowy związek pośredni **26** otrzymano z zadawalającą wydajnością, jednakże wbrew analogii z syntezą Itzsteina (Schemat 2), zawiodły wszystkie próby zamknięcia pierścienia oksazolinowego.

Wobec tych trudności okazało się koniecznym zmodyfikowanie planu syntezy. Jak zaznaczono w dolnej części schematu, użyto teraz trimetylosililoksy dienu **28** (dien Danishefsky'ego) otrzymując po hydrolizie keton **29**. Po wielu komplikacjach uzyskano dogodny związek pośredni o kompletnym szkielecie węglowym **30**. Otwarcie pierścienia oksiranowego w **30** przebiegło z udziałem winylogowo sąsiadującej grupy acetamidowej i doprowadziło do zamknięcia pierścienia oksazolu, a po kilku prostych transformacjach otrzymano związek **27**. Grupy aminową lub guanidynową wprowadzono do związku **27** stosując znane wcześniej metody.

Pochodne **19** i **20** wykazały istotną aktywność w próbach na hamowanie neuroaminidazy wirusów grypy. W konkluzji pracy uznano analogi karbocyliczne za bardzo obiecujące.

Inną strategię syntezy karbocyklicznych analogów kwasu neuroaminowego przyjęto w firmie Gilead Science (USA) i później w Hoffamann – La Roche (Bazylea) [26, 27]. Za podstawowe surowce wybrano tu dostępny w handlu kwas (–)-chinowy oraz – również dostępny, ale bardzo drogi kwas (–)-szikimowy (Rys. 9).



Rysunek 9. Zestawienie struktur karbocyklicznych analogów Gilead-Roche'a, modelowego jonu oksoniowego i surowców

Zestawienie struktur postulowanego jonu oksoniowego generowanego z kwasu *N*-acetyloneuroaminowego z kwasem chinowym wskazuje na podobny sposób rozmieszczenia grup funkcyjnych.

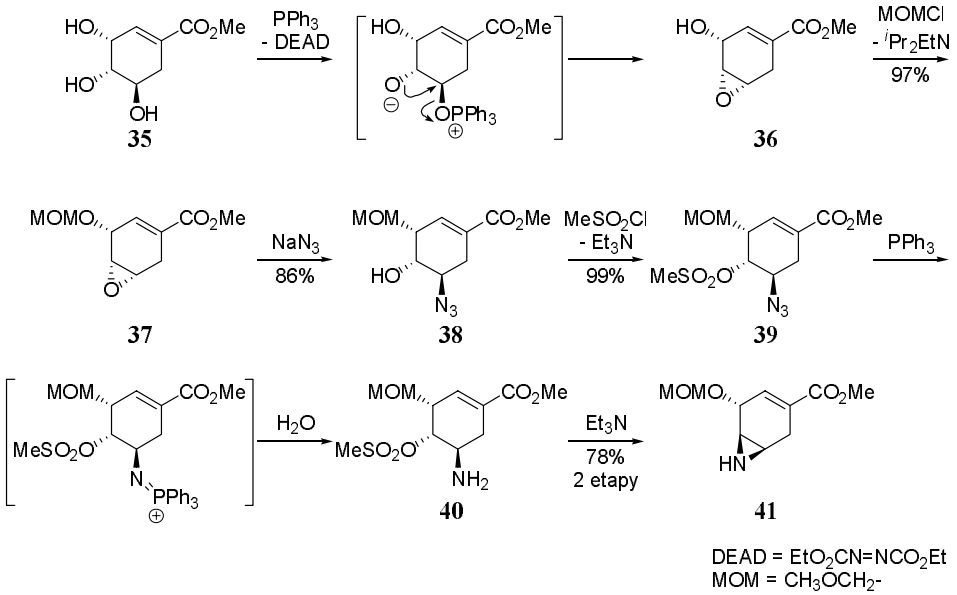
Uwzględniając znane zależności struktura–aktywność, do pierwszych syntez wytypowano dwa analogi, **33** i **34**. W odniesieniu do kwasu chinowego w obydwu tych związkach planowano zastąpienie podstawników tlenowych w pozycjach 3 i 4 odpowiednimi podstawnikami azotowymi. W pozycji 5 pozostawiono grupę hydroksylową. Różnica polega na położeniu wiązania etylenowego, „w kierunku" grupy hydroksylowej **33** lub aminowej **34**. Pod względem struktury elektronowej analog **33** wydawał się bliższy pierwowzorowi; z drugiej strony w **34** podwójne wiązanie jest ulokowane jak w związku Zanamivir.

4. SYNTEZA KARBOCYKLICZNYCH ANALOGÓW GILEAD-ROCHE PIERWSZEJ GENERACJI. ROZWÓJ BADAŃ NAD TAMIFLU®

SYNTEZA ANALOGU Z WIĄZANIEM PODWÓJNYM „W KIERUNKU GRUPY HYDROKSYLOWEJ"

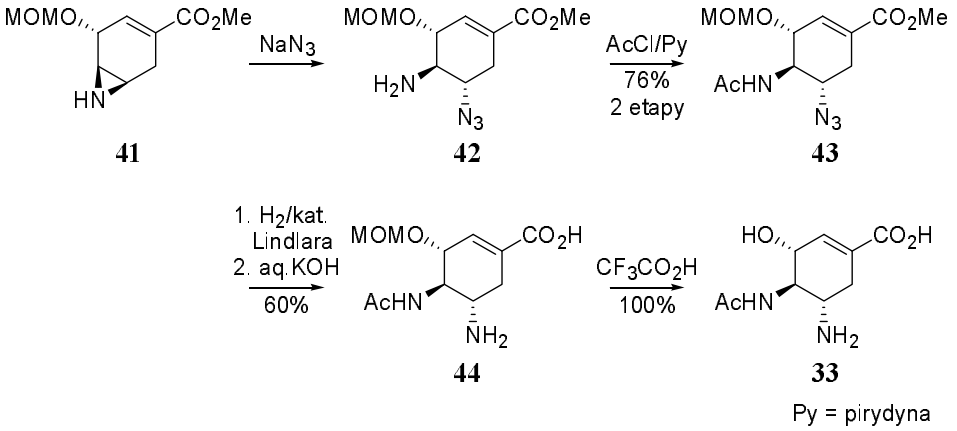
Syntezę analogu **33** rozpoczęto wychodząc z estru metylowego kwasu szikimowego **35** (Schemat 5). Głównym zamysłem było uzyskanie pierścienia azyrydynowego w miejsce grup hydroksylowych w pozycjach 4 i 5, a następnie otwarcie azyrydyny anionem azydkowym.

Na ester szikimowy działano diazakarboksylanem etylu (DAED) i trifenylofosfiną w warunkach „inwersji Mitsunobu". Otrzymano epoksyd **36** jako jedyny produkt [28]. Wynik reakcji odzwierciedla łatwość tworzenia epoksydu z *trans*-diolu, aczkolwiek najbardziej reaktywną wydaje się allilowa grupa hydroksylowa. Po zabezpieczeniu wolnej grupy hydroksylowej w postaci eteru metoksymetylowego (MOM) pierścień epoksydowy **37** otworzono azydkiem sodu. W produkcie **38** grupę hydroksylową zestryfikowano chlorkiem kwasu metanosulfonowego, a następnie grupę azydkową zredukowano za pomocą trifenylofosfiny. Kolejna reakcja wewnątrzcząsteczkowego podstawienia doprowadziła do pochodnej azyrydyny **41**.



Schemat 5

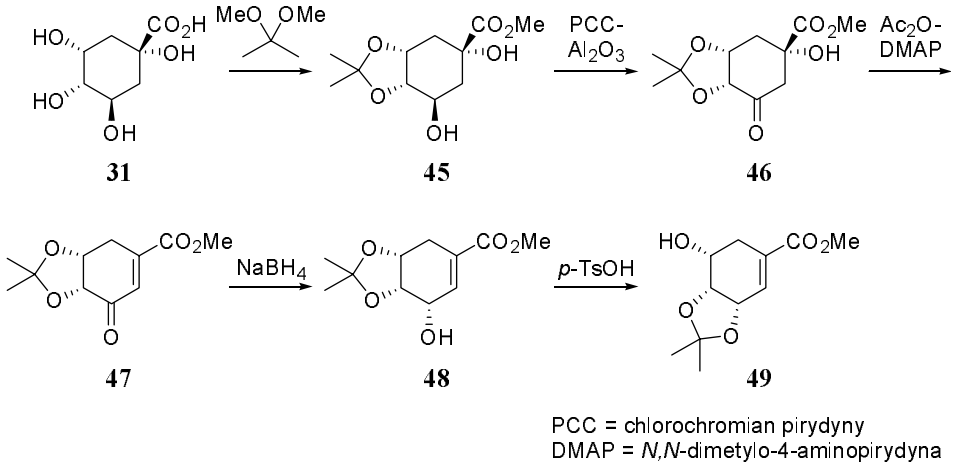
Pierścień azyrydynowy w **41** (Schemat 6) otworzono w analogicznych warunkach jak przy epoksydzie **37** otrzymując amino-azydek **42**. Grupę aminową acetylowano. Następnie redukcja grupy azydkowej w związku **43**, tym razem wodorem na katalizatorze Lindlara, i selektywna hydroliza estru metylowego prowadziły do związku **44**. Usunięcie grupy MOM zakończyło syntezę. Warto odnotować wysokie wydajności osiągnięte w każdym z przejść.



Schemat 6

SYNTEZA ANALOGU Z WIĄZANIEM PODWÓJNYM „W KIERUNKU GRUPY AMINOWEJ"

Syntezę związku **34** prowadzono wychodząc z kwasu chinowego, a właściwie z pochodnej **49** przygotowanej według wskazówek literaturowych [29] (Schemat 7).



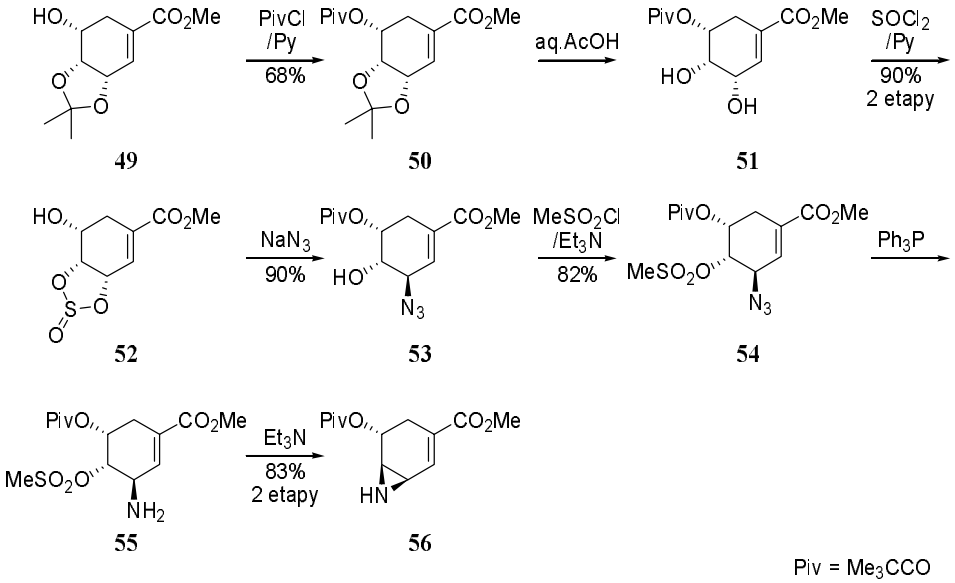
Schemat 7

Po otrzymaniu acetonidu estru metylowego **45** drugorzędowy alkohol utleniono chlorochromianem pirydyniowym (PCC). *β*-Hydroksyketon **46** odwodniono w łagodnych warunkach bez naruszenia ugrupowania acetonidowego. Redukcja ketonu **47** borowodorkiem sodu przebiegła całkowicie stereoselektywnie dając alkohol **48**, tj. z podejściem odczynnika od mniej zatłoczonej strony cząsteczki. Transketalizacja **48** w warunkach kwaśnych prowadziła do bardziej stabilnego termodynamicznie izomeru **49**.

Wolną grupę hydroksylową w związku **49** zabezpieczono w postaci estru kwasu piwalowego **50** (Schemat 8), a następnie w łagodnych warunkach uwolniono ugrupowanie *cis*-diolu. Diol **51** przekształcono w cykliczny siarczyn działaniem chlorku tionylu w pirydynie. Reakcja siarczynu **52** z azydkiem sodowym doprowadziła z wysoką wydajnością do hydroksy-azydku **53**.

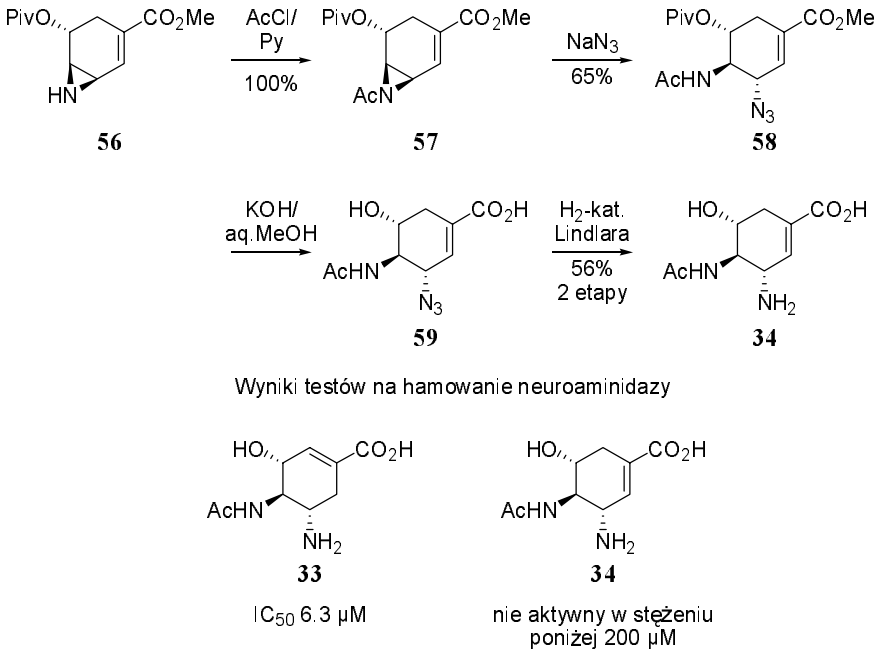
Należy odnotować, że znane są tylko nieliczne przypadki stosowania cyklicznych siarczynów w reakcji substytucji nukleofilowej. Zwykle stosuje się siarczany, wytwarzane z dioli w reakcji z chlorkiem sulfurylu lub przez utlenienie siarczynów. Wysoką reaktywność związku **52** można wytłumaczyć allilową pozycją grupy odchodzącej.

Następnie grupę hydroksylową w **53** mesylowano, a grupę azydkową zredukowano trifenylofosfiną do grupy aminowej, co pozwoliło na otrzymanie azyrydyny **56**.



Schemat 8

W końcowych etapach tej wielostopniowej syntezy (Schemat 9) azyrydynę **56** acetylowano, a amid **57** poddano działaniu azydku sodowego.



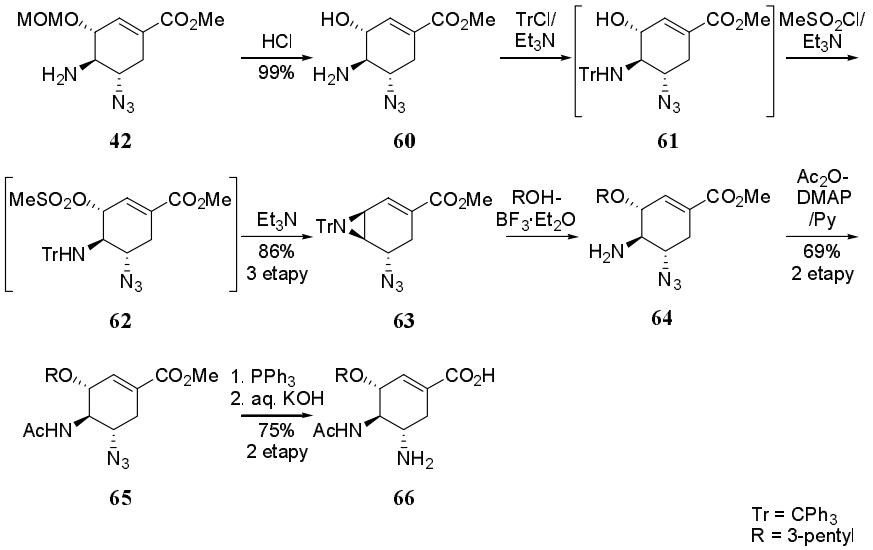
Schemat 9

Hydroliza grupy estrowej i redukcja grupy azydkowej do aminowej pozwoliły otrzymać drugi z planowanych regioizomerów, związek **34**.

Obydwa otrzymane analogi poddano porównawczym badaniom biologicznym. Związek **33** hamował działanie enzymu w 50% (IC_{50}) przy stężeniu 6.3 μM, natomiast związek **34** nie wykazywał aktywności w stężeniach niższych od 200 μM. W ten sposób związek **33** został zakwalifikowany do dalszych modyfikacji.

MODYFIKOWANIE STRUKTURY 33. SYNTEZA ANALOGÓW Z PODSTAWNIKAMI ALKOKSYLOWYMI

Analiza wyników badań rentgenostrukturalnych nad kompleksami kwasów neuroaminowych z neuroaminidazami miały kluczowe znaczenie dla projektowania modyfikacji związku **33**. Nie wykazały one oddziaływań grupy hydroksylowej w pozycji 7 („pierwsza" grupa hydroksylowa w łańcuchu glicerynowym) z żadnym z aminokwasów centrum aktywnego. Podjęto zatem przypuszczenie, że tę grupę można pominąć bez uszczerbku dla powinowactwa. Ze struktur X-ray wynikało również, że dwie dalsze grupy hydroksylowe łańcucha glicerynowego tworzą bidentalne wiązania z Glu276 oraz, że „środkowy" atom węgla łańcucha glicerynowego oddziaływuje hydrofobowo z łańcuchem węglowodorowym Arg224. Oddziaływania hydrofobowe uznano za szczególnie ważne: ich optymalizacja mogłaby prowadzić do korzystnych relacji rozpuszczalności w wodzie i lipofilowości, a w konsekwencji do produkcji leku doustnego. Ostatecznie wybrano grupę alkoksylową jako odpowiednik łańcucha glicerynowego. Syntezę pochodnych alkoksylowych ilustruje Schemat 10.



Schemat 10

W związku **42** (Schemat 10) usunięto zabezpieczającą grupę metoksymetylową. Amino-alkohol **60** przeprowadzono w pochodną trifenylometylową **61** i kolejno (bez wydzielania związków pośrednich) w mesylan **62** i azyrydynę **63**. Pierścień azyrydynowy otwierano przy użyciu wybranych alkoholi w reakcji katalizowanej eteratem trifluorku boru. Otwarcie pierścienia następowało wyłącznie w pozycji allilowej. Grupę aminową w związku **64** acetylowano, a następnie grupę azydkową zredukowano. Końcową reakcją było uwolnienie grupy karboksylowej poprzez alkaliczną hydrolizę estru.

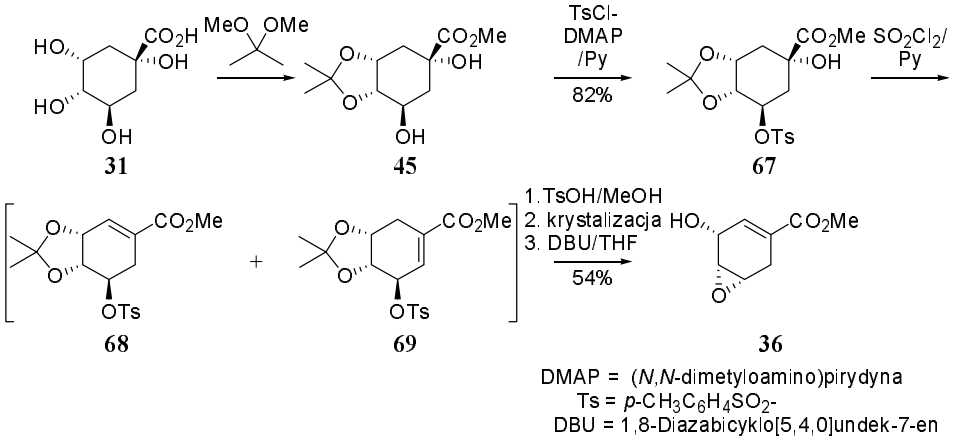
Według tej metody otrzymano osiem analogów. Okazało się, że każdy z nich był bardziej aktywny w testach enzymatycznych od macierzystej hydroksy-pochodnej **33**. Najwyższą aktywność wykazał związek z podstawnikiem 3-pentylowym **66** (R = H; IC_{50} = 6300 nM; R = $(CH_3CH_2)_2CH$; IC_{50} = 1 nM). Okazał się on równie skuteczny jak Zanimivir (ester etylowy **66** to Oseltamivir).

5. SYNTEZY TAMIFLU® Z KWASU (–)-CHINOWEGO LUB (–)-SZIKIMOWEGO

Metoda syntezy związku **66** przedstawiona na schematach 5, 6 i 10 miała poważne ograniczenie. Kwas szikimowy, użyty jako związek wyjściowy, był zbyt drogi, aby wytwarzać z niego kilogramy produktu potrzebne do badań klinicznych. Wiele uwagi poświęcono alternatywnym drogom syntezy **66** z użyciem kwasu (–)-chinowego i nowym metodom uzyskiwania kwasu szikimowego.

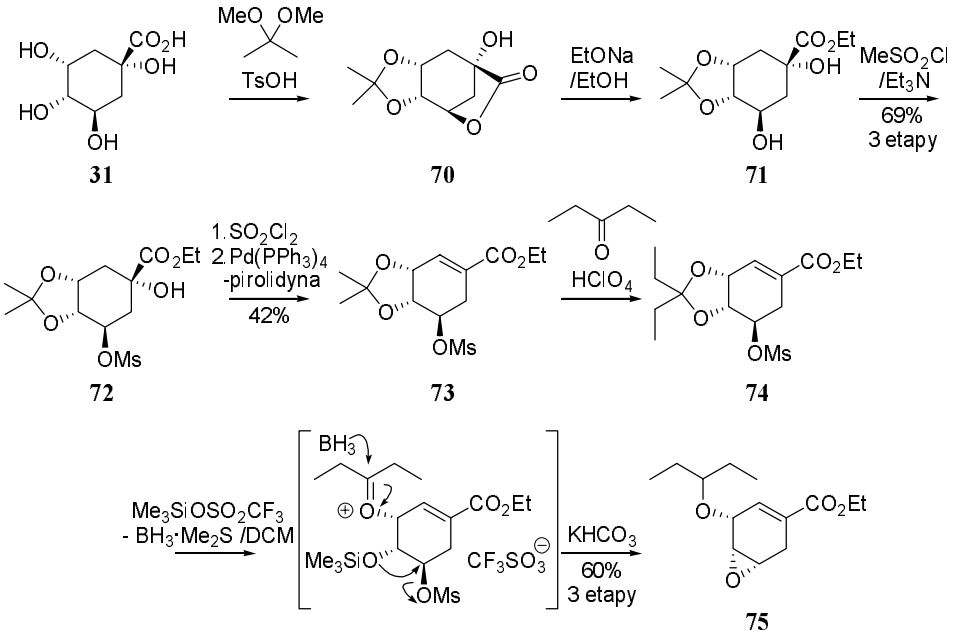
Jeszcze podczas badań nad syntezą analogów I generacji (Schemat 7) wykazano [26], że zamiast kwasu szikimowego może być użyty kwas chinowy przy niewielkim przedłużeniu cyklu reakcji (Schemat 11). Bardziej zaawansowaną syntezę związku pośredniego **36** z kwasu chinowego ilustruje Schemat 11.

Na kwas chinowy działano dimetoksypropanem w sposób analogiczny do metody literaturowej [30], co prowadziło do zabezpieczenia ugrupowania *cis*-diolu w postaci acetonidu i estryfikacji grupy karboksylowej. Następnie tosylowano wolną grupę hydroksylową w **45**, a trzeciorzędową grupę hydroksylową w **67** eliminowano stosując chlorek sulfurylu w pirydynie. Reakcja nie była całkowicie regioselektywna, jednak niepożądany produkt uboczny usunięto bez stosowania chromatografii. Mieszaninę **68** i **69** w metanolu zawierającym katalityczną ilość kwasu *p*-toluenosulfonowego ogrzewano w temperaturze wrzenia. Diol otrzymano z 54% wydajnością (w dwu etapach) w postaci krystalicznej (regioizomer podlegał eliminacji kwasu *p*-toluenosulfonowego i aromatyzacji). Traktowanie diolu (nie pokazany na schemacie) diazabicykloundecenem (DBU) prowadziło do **36**. Preparację stosowano w skali kilkudziesięciu gramów.



Schemat 11

W „praktycznej" syntezie **1** w skali wielu kilogramów z kwasu chinowego i/lub szikimowego opracowanej przez chemików firm Gilead i Roche zastosowano wiele nowych rozwiązań (Schemat 12).

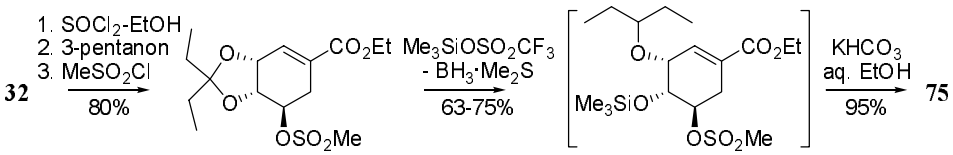


Schemat 12

Rohloff i współautorzy [31] opisali, że działanie na kwas chinowy **31** (szarża 20 kg!) dimetoksypropanem wobec kwasu *p*-toluenosulfonowego we wrzącym ace-

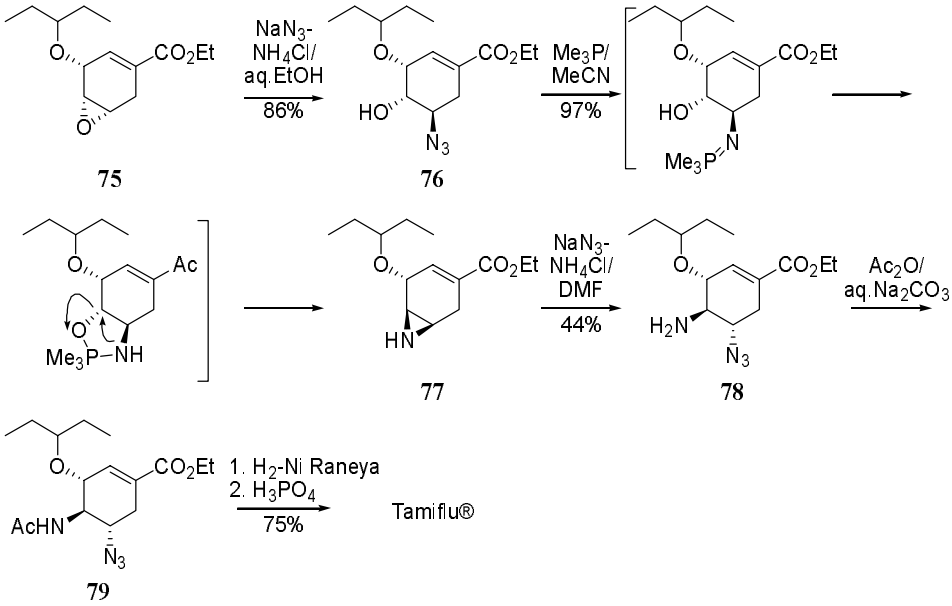
tonie prowadzi do utworzenia acetonidu i zamknięcia pierścienia laktonowego (**70**, Schemat 12). Alkoholiza tego związku dostarczyła dihydroksy ester **71**. Drugorzędową grupę hydroksylową estryfikowano chlorkiem metanosulfonowym uzyskując mesylan **72** z całkowitą wydajnością 69% w trzech przejściach. Do eliminacji trzeciorzędowej grupy hydroksylowej użyto chlorku sulfurylu w pirydynie. Obok związku **73** (wydajność 42%) utworzył się również jego regioizomer (porównaj Schemat 11) oraz oleista chloropochodna.

Produkty uboczne usunięto poprzez działanie na surową mieszaninę reakcyjną pirolidyną wobec katalizatora palladowego (nastąpiło przyłączenie tej aminy w miejsce allilowej grupy metanosulfonowej), przemycie roztworem kwasu siarkowego a następnie krystalizację. Transketalizacja z użyciem pentan-3-onu dała prawie ilościowo **74**. Ten ostatni związek redukowano kompleksem borowodoru z siarczkiem dimetylu wobec triflanu trimetylosililowego [32]. Reakcja przebiegała poprzez jon oksoniowy zaznaczony na schemacie. W wyniku starannego doboru warunków, autorzy zdołali osiągnąć wysoką regioselektywność tej reakcji (10:1, izomer uboczny pominięto na schemacie). Po wewnątrzcząsteczkowej eliminacji kwasu metanosulfonowego utworzył się kluczowy epoksyd **75** z wydajnością 60% z acetalu **73**.



Schemat 13

Opracowana przez tych samych autorów technologiczna synteza epoksydu **75** z kwasu (–)-szikimowego **32** jest oczywiście prostsza (Schemat 13). Zastosowano metody omówione powyżej.



Schemat 14

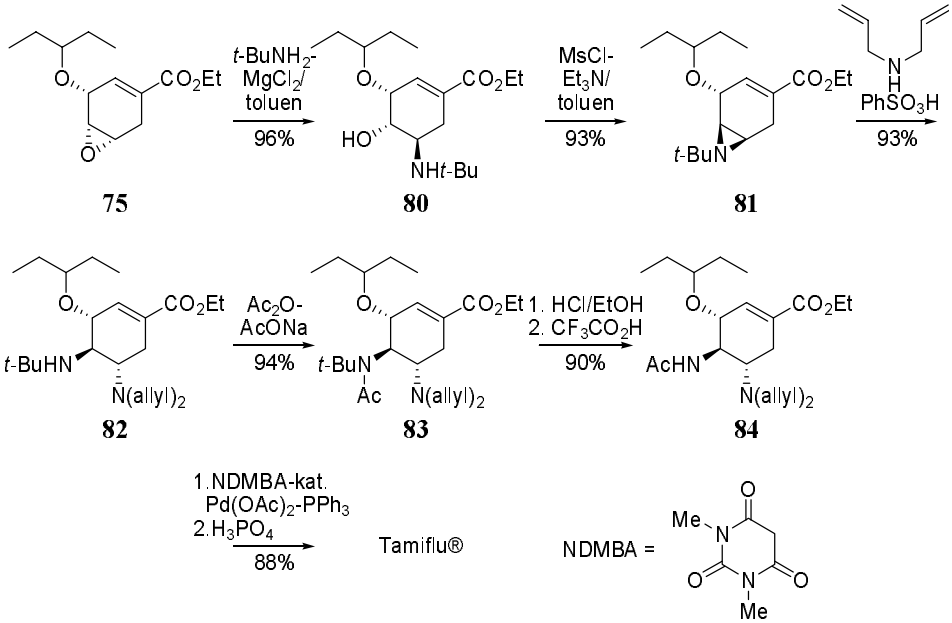
Otwarcie pierścienia oksiranowego w **75** azydkiem sodowym w obecności chlorku amonu w wodnym etanolu prowadziło do azydo-alkoholu **76** (Schemat 14) i jego regioizomeru w stosunku 10:1. W odróżnieniu od syntezy ilustrowanej Schematem 8, teraz użyto bardziej reaktywnej i mniej szkodliwej dla środowiska trimetylofosfiny (związek piroforyczny). Uzyskano azyrydynę **77** (o czystości około 70%). Następnie, pierścień azyrydynowy otworzono jonem azydkowym i surowy produkt **78** zacylowano w warunkach Schotten-Baumanna. Uzyskano krystaliczny i łatwy do oczyszczenia amid **79** (wydajność całkowita 37% z epoksydu **75**).

Kończącymi etapami były redukcja grupy azydkowej wodorem na niklu Raneya w etanolu i utworzenie soli kwasu fosforowego, a produkt oczyszczono przez krystalizację.

Podsumowując: synteza z kwasu chinowego obejmowała 12 etapów, a całkowita wydajność Tamiflu® **1** wyniosła 4,4%, zaś z kwasu szikimowego – 10 etapów z wydajnością 21%. W całej sekwencji przejść nie stosowano chromatografii i tylko kilka produktów pośrednich oczyszczano przez krystalizację.

Kończąc omówienie syntez parcjalnych przedstawiamy najnowsze metody pozwalające uniknąć uciążliwych odczynników – azydku sodu i stechiometrycznych ilości fosfin. Harrington i współautorzy [33] opracowali proces, w którym pierścień epoksydu **75** otwarto z użyciem kompleksu *tert*-butyloaminy z chlorkiem magnezu w toluenie w temperaturze 50° (Schemat 15). Mesylowanie grupy hydroksylowej w **80** i traktowanie surowego mesylanu trietyloaminą dało azyrydynę **81**. Drugi atom azotu wprowadzono do cząsteczki **81** działając diallilloaminą wobec kwasu benzenosulfonowego w temperaturze 120° (bez rozpuszczalnika). Acylowanie **82**

doprowadziło do pochodnej aminowej, którą oczyszczono w postaci chlorowodorku i następnie traktowano kwasem trifluorooctowym. Po usunięciu grupy *tert*-butylowej, grupy allilowe wymieniono na atomy wodoru w reakcji **84** z kwasem 3,5-dimetylobarbiturowym [34] wobec katalitycznej ilości $Pd(OAc)_2$ (1 mol%) i trifenylofosfiny (4 mol%). Wykorzystano katalizowane palladem przeniesienie grupy allilowej (poprzez kompleks π-allilowy). Alternatywnie, grupę allilową można również usunąć przez działanie etanoloaminą i 10% palladem na węglu aktywnym w etanolu w temperaturze wrzenia [35].

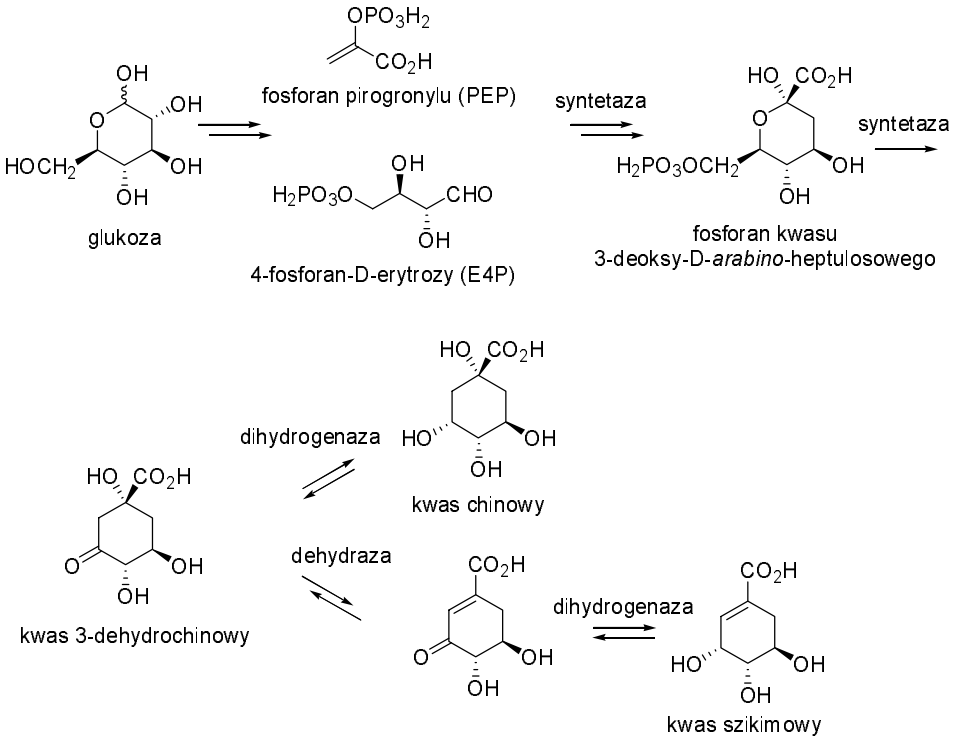


Schemat 15

6. SUROWCE DO PRODUKCJI TAMIFLU®. OTRZYMYWANIE KWASÓW (–)-CHINOWEGO I (–)-SZIKIMOWEGO Z UŻYCIEM GENETYCZNIE MODYFIKOWANEGO SZCZEPU *ESCHERICHIA COLI*

Kwas (–)-chinowy izoluje się z kory drzewa chinowego *Cinchoma* uprawianego w Ameryce Południowej, w Indiach i na Jawie. Jest on stosowany jako kwasek spożywczy i stosunkowo tani surowiec w syntezie innych produktów naturalnych [36]. Jednakże nie jest całkiem pewna dostępność tego surowca w ilościach sięgających wielu ton. Kwas szikimowy pozyskuje się z roślin rodzaju *Illicium sp.*, nie będących w uprawie przemysłowej. Jak dotąd nie udało się opracować wydajnej transformacji kwasu chinowego w szikimowy.

Kwas szikimowy występuje w wielu roślinach i mikroorganizmach (często razem z kwasem chinowym) i został zidentyfikowany jako ważne ogniwo w biosyntezie związków aromatycznych z cukrów (tzw. szlak kwasu szikimowego). Nieliczne mikroorganizmy, np. *Klebsiella pneumoniae*, mają zdolność użytkowania tego kwasu jako źródła atomów węgla. Frost i współpracownicy [37] niedawno skonstruowali „biokatalizator" w drodze genetycznej modyfikacji szczepu *Escherichia coli* AB2848 stosowanego do produkcji L-fenyloalaniny z glukozy (nie transformującego kwasu szikimowego) wzorowanej na *Klebsiella pneumoniae*. Modyfikacja umożliwiła wytwarzanie kwasu szikimowego [37] (Schemat 16).



Schemat 16

Glukoza ulega transformacji do fosforanu erytrozy oraz fosforanu pirogronylu. Wobec specyficznej syntetazy te bloki budulcowe tworzą fosforan kwasu 3-deoksy--D-*arabino*-heptulosowego i wobec kolejnej syntetazy – kwas 3-dehydrochinowy. Kolejne specyficzne procesy enzymatyczne prowadzą do kwasu szikimowego. W nowszych badaniach [38, 39] stwierdzono, że kwas szikimowy jest zanieczyszczony kwasem chinowym (poniżej 10%), a główny produkt oczyszcza się przez krystalizację.

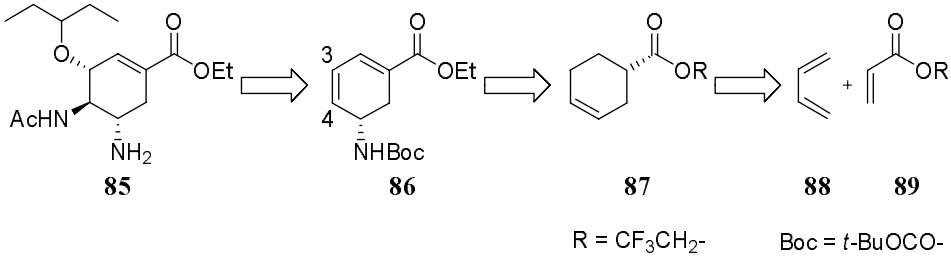
Technologiczna produkcja kwasu szikimowego z glukozy wydaje się całkiem realna. W szerszej perspektywie można oczekiwać, że także kwas chinowy i inne produkty naturalne izolowane z roślin będą w przyszłości dostępne w drodze fermentacji cukrów z udziałem genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów.

7. SYNTEZY TOTALNE

Opracowanie skutecznych metod totalnej syntezy pozwoliłoby uniezależnić produkcję Tamiflu® od surowców pochodzenia naturalnego. W bieżącym roku ukazały się trzy pierwsze publikacje poświęcone temu zagadnieniu.

SYNTEZA E.J. COREY

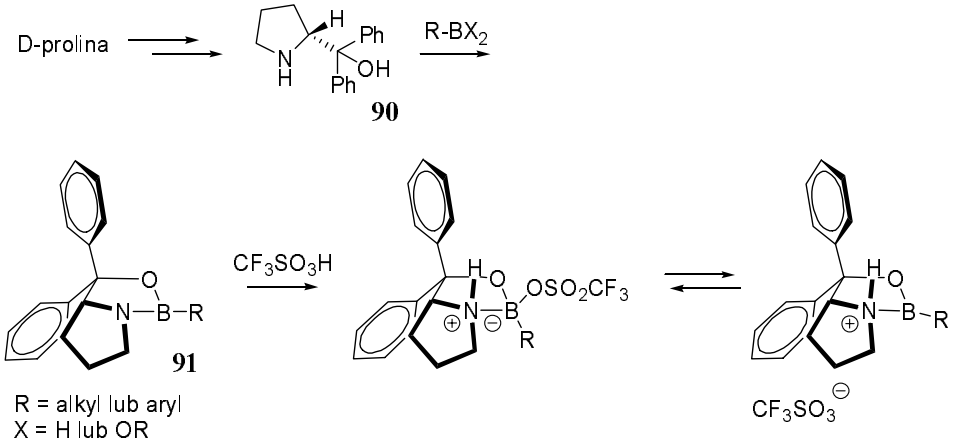
E.J. Corey i współpracownicy [40] z Uniwersytetu Harvarda zaproponowali drogę syntetyczną rozpoczynającą się od enancjoselektywnej reakcji Dielsa–Aldera. Zasadniczą koncepcję tych autorów ilustruje schemat retrosyntetyczny (Schmat 17).



Schemat 17

Produkt docelowy **85** został utworzony w wyniku funkcjonalizacji wiązania etylenowego C3–C4 w dienie **86**. Tej operacji poświęcono znaczną uwagę, a w rezultacie wynaleziono nową ogólną metodę haloamidowania [41]. Związek pośredni **86** otrzymano w kilku etapach z optycznie czynnej pochodnej kwasu heks-3-eno karboksylowego **87**. Ten ostatni związek wytworzono z butadienu **88** i estru akrylowego **89** w enancjoselektywnej reakcji [2+4] cykloaddycji katalizowanej chiralnymi oksazaborolidynami.

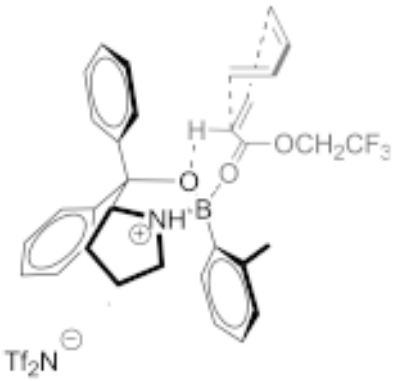
Oksazaborolidyny otrzymuje się w reakcji aminoalkoholi z boranami lub pochodnymi kwasu borowego. Historycznie, najpierw zastosowano te związki w charakterze katalizatorów w redukcji ketonów boranami [42–44]. Jak pokazano na Schemacie 18, aminoalkohol **90** otrzymany z D-proliny tworzy pochodną **91** z pierścieniem pyrolidynowym i oksazaborolidynowym. Traktowanie **91** kwasami, np. kwasem trifluorometanosulfonowym, daje kationowe kwasy Lewisa, które okazały się sprawnymi katalizatorami wielu reakcji, zwłaszcza w reakcji Dielsa–Aldera [45].



Schemat 18

Do syntezy pochodnej kwasu cykloheks-3-eno karboksylowego **87** (Schemat 19) wybrano nieaktywowany dien – butadien **88**, a w charakterze dienofila trifluoroetylo akrylan **89** oraz oksazaborolidynę, wyposażoną w grupę *o*-tolilową i anion bis-(trifluorometanosulfonylo)iminiowy w charakterze katalizatora [46] (10 mol%, odczynnik dostępny w handlu). Otrzymano produkt **87** o nadmiarze enancjomerycznym (ee) ponad 97% ze znakomitą wydajnością.

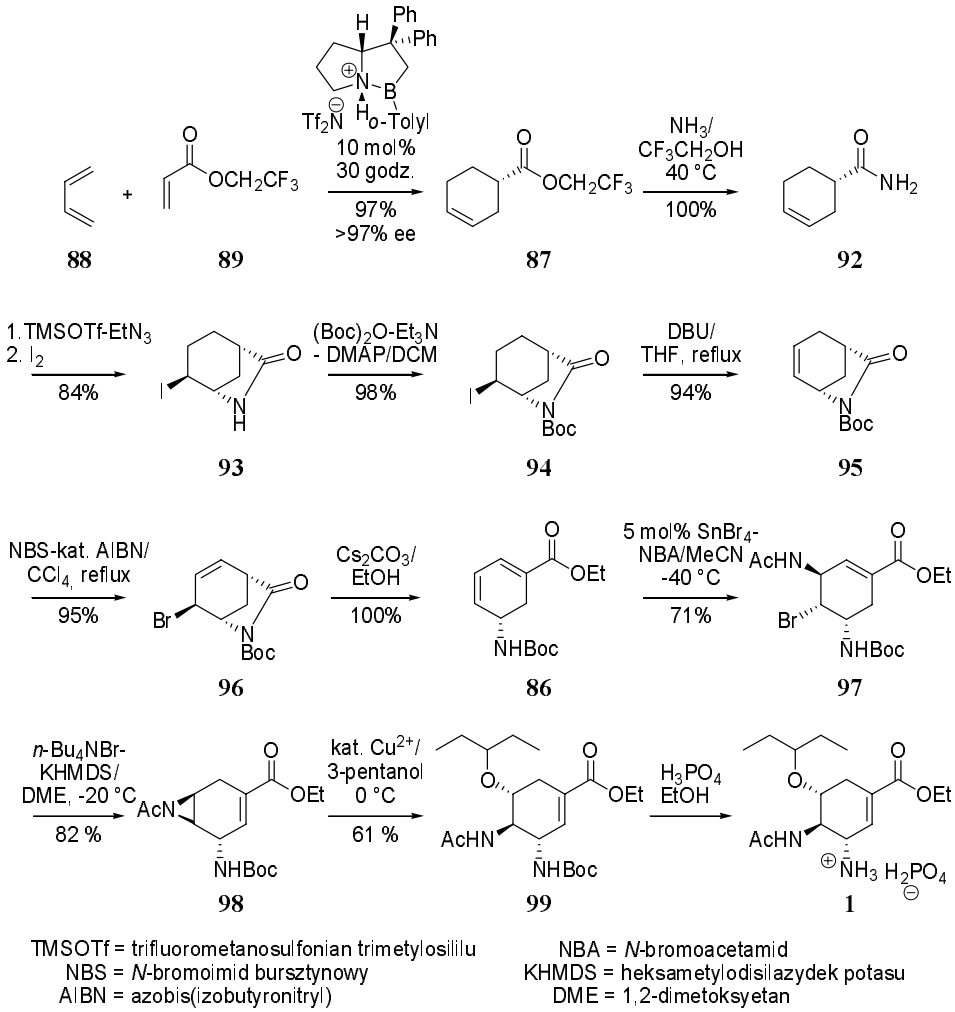
Stereochemiczny przebieg addycji ilustruje Rys. 10. Dienofil wiąże się z katalizatorem poprzez oddziaływanie karbonylowego atomu tlenu i protonu w pozycji α, odpowiednio z atomem boru i atomem tlenu pierścienia oksazaborolidyny. Takie usytuowanie dienofila i katalizatora wymusza podejście dienu od strony „górnej" – egzo.



Rysunek 10. Stan przejściowy w enancjoselektywnej reakcji Dielsa–Aldera

Ester **87** poddano amonolizie, a następnie amid **92** cyklizowano według znanej metody [47]. Po zabezpieczeniu grupy amidowej w postaci pochodnej *tert*-butoksy-

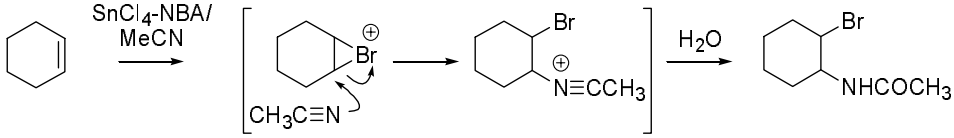
karbonylowej (Boc) **94**, eliminowano jodowodór w reakcji z DBU. Otrzymany związek **95** poddano najpierw rodnikowemu bromowaniu, a następnie eliminowano bromowodór, otrzymując dien **86**.



Schemat 19

Dien **86** traktowano *N*-bromoacetamidem w obecności bromku cyny (5 mol%) w acetonitrylu, co prowadziło do bromo-acetamido pochodnej **97** z wydajnością 75%. Ta metoda przyłączenia atomu bromu i ugrupowania acetamidowego do wiązania etylenowego ma charakter ogólny. Mechanizm reakcji [41] objaśnia Schemat 20. Pierwszym etapem jest addycja do wiązania podwójnego kationu bromoniowego, wytworzonego z *N*-bromoacetamidu i kwasu Lewisa. Acetonitryl działa jako nukleofil. Hydroliza następuje pod wpływem śladów wody obecnych w mieszaninie

(reakcji sprzyja dodatek stechiometrycznej ilości wody) lub w trakcie wyodrębniania produktu.



Schemat 20

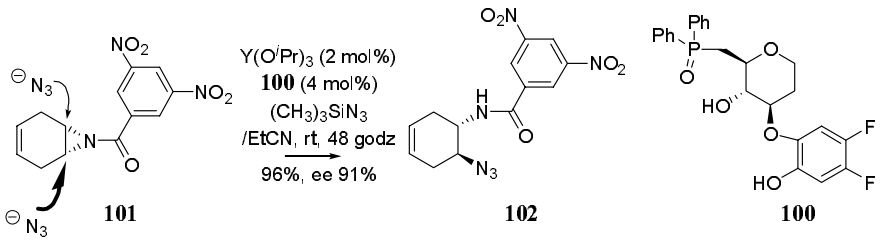
Wracając do cyklu syntetycznego, selektywne deprotonowanie grupy acetamidowej w związku **97** silną, przestrzennie zatłoczoną zasadą powoduje zamknięcie pierścienia *N*-acetyloazyrydyny **98**. Funkcję takiej zasady pełni heksametylodisilazydek tetra-*n*-butyloamoniowy [$^{n}Bu_4N^+$ $N(SiMe_3)_2^-$], generowany *in situ*.

Otrzymaną azyrydynę otwarto regioselektywnie stosując 3-pentanol w obecności kationów miedzi(II). Wydajność tego procesu nie była wysoka (61%), ale – jak zaznaczyli autorzy – istnieje możliwość optymalizacji. Ostatnim, właściwie formalnym etapem było usunięcie grupy Boc i utworzenie soli fosforanowej **1**.

Synteza obejmuje 12 etapów i dostarcza ostateczny produkt z wydajnością 25,3%. Należy dodać, że syntetyzowano również enancjomer Tamiflu® (z użyciem ligandu otrzymanego z tańszej L-proliny) oraz, że ligandy chiralnego katalizatora odzyskuje się w sposób prosty i wydajny.

SYNTEZA M. SHIBASAKI

M. Shibasaki i współpracownicy [48] z Uniwersytetu Tokijskiego zdołali wykorzystać w syntezie Tamiflu® doświadczenia zgromadzone w trakcie rozległych badań nad reakcjami „katalitycznej enancjoselektywnej desymetryzacji" *mezo*-azyrydyn oraz nad konstrukcją chiralnych katalizatorów zawierających metale ziem rzadkich [49, 50]. Za główny etap syntezy można uznać pieczołowicie optymalizowaną reakcję otwarcia pierścienia azyrydyny aktywowanej grupą 3,5-dinitrobenzoilową w **101** z azydkiem trimetylosililowym wobec kompleksu itru i chiralnego ligandu **100** (Schemat 21).

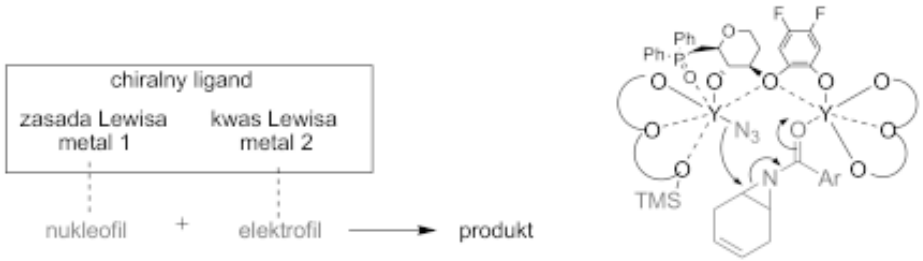


Schemat 21

Cząsteczka azyrydyny **101** jest achiralna ze względu na obecność płaszczyzny symetrii. Katalizator wytworzony z tri-*izo*-propoksy itru oraz ligandu **100** różnicuje dwie „symetryczne" pozycje w addycji nukleofila (anionu azydkowego). Otrzymano azydek **102** z wydajnością 96% i o ee 91% (jedna rekrystalizacja z *izo*-propanolu dała produkt o ee 99% z wydajnością 72%).

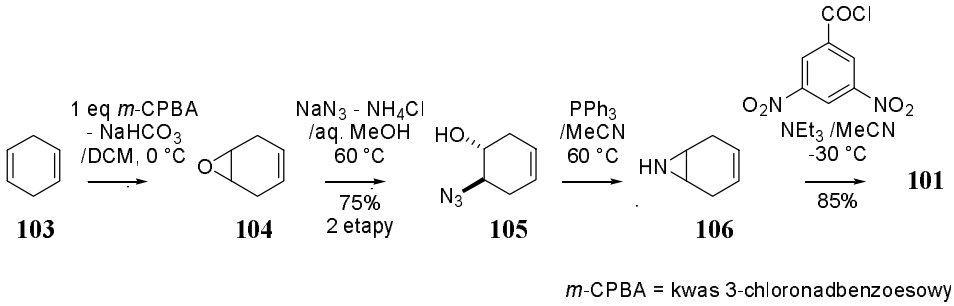
Katalizator wytwarza się *in situ* w reakcji $Y(O^iPr)_3$ (2 mol%) i ligandu **100** (4 mol%). Zasada działania bimetalicznych „współpracujących" (ang. *cooperative*) katalizatorów została przedstawiona na Rysunku 11. Dwa centra katalityczne połączone są z chiralnym ligandem: centrum zasadowe aktywujące nukleofil, np. anion azydkowy, oraz centrum kwasowe aktywujące elektrofil, np. grupę karbonylową.

Uważa się, że w katalizatorze Shibasaki (Rysunek 11) połączone są trzy cząstki ligandu (krańcowe zaznaczone symbolicznie) z dwoma atomami itru. Funkcje zasady Lewisa pełni ugrupowanie tlenku fosfiny, a kwasu – ugrupowanie difluorokatecholu. Aktywacja nukleofila (azydku trimetylosililowego) następuje za pośrednictwem atomu itru znajdującego się w pobliżu ugrupowania tlenku fosfiny. Aktywacja aryloilo-azyrydyny przebiega na atomie metalu przy centrum kwasowym. Nadmiar ligandu ponad ilość stechiometryczną (3:2) może pełnić rolę czynnika protonującego.



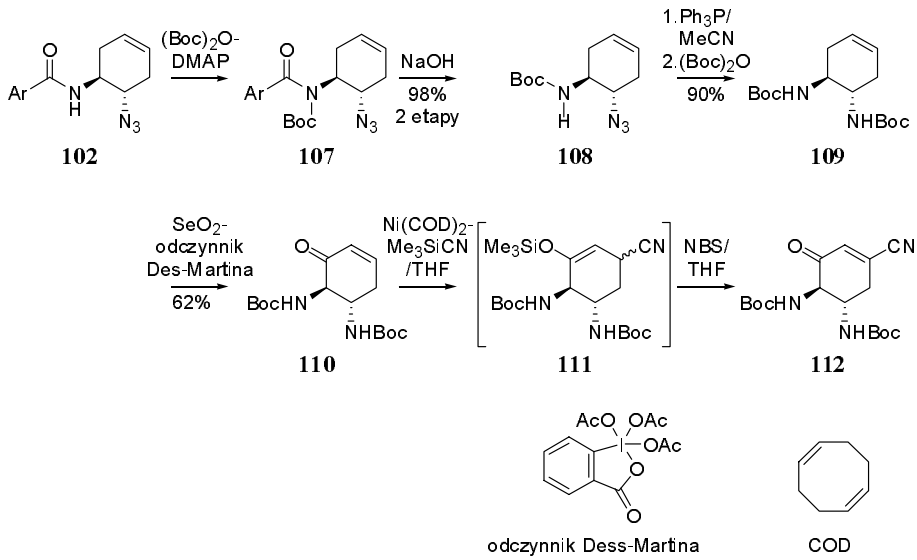
Rysunek 11. „Współpracujący" katalizator

Pochodna azyrydyny **101**, użyta w reakcji desymetryzacji, została otrzymana według Schematu 22. 1,4-Cykloheksadien **103** przeprowadzono w epoksyd **104**, a następnie w azydo–alkohol **105**. Redukcja tego związku trifenylofosfiną prowadziła do azyrydyny **106** (porównaj, Schemat 14). Azyrydynę acylowano chlorkiem 3,5-dinitrobenzoilu.



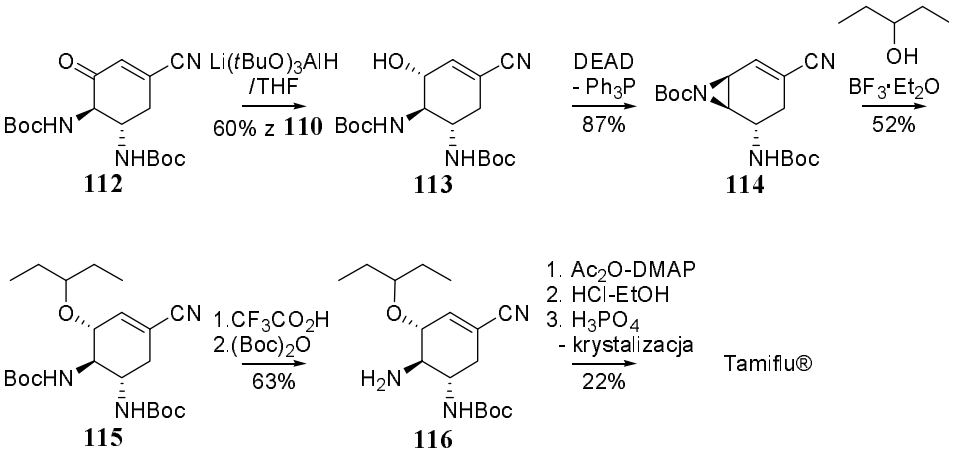
Schemat 22

Synteza Tamiflu® z tak otrzymanego, optycznie czystego azydo–amidu **102** przebiegała przez wiele etapów (Schemat 23). Najpierw podstawiono grupą Boc amidowy atom wodoru, a następnie usunięto w drodze hydrolizy grupę 3,5-dinitrobenzoesową. W otrzymanej pochodnej **108** grupę azydkową zredukowano trifenylofosfiną i utworzoną grupę aminową zabezpieczono w postaci pochodnej Boc **109**. Związek **109** charakteryzuje chiralność z osią symetrii C_2. Utlenienie **109** dwutlenkiem selenu w obecności odczynnika Dess–Martina w dioksanie prowadziło do mieszaniny α,β-nienasyconego ketonu **110** i odpowiadających mu alkoholi allilowych. Surowy produkt tej reakcji traktowano oddzielnie odczynnikiem Dess–Martina, co dało czysty keton **110**. Ten ostatni związek poddano działaniu cyjanku trimetylosililowego i katalizatora niklowego, a surowy produkt sprzężonej addycji **111** bromowano *N*-bromoimidem bursztynowym. Otrzymany produkt **112** zawiera kompletny szkielet węglowy Tamiflu®.



Schemat 23

Grupę ketonową w **112** zredukowano chemo- i diastereoselektywnie wodorkiem tri-(*tert*-butoksy)litowoglinowym (Schemat 24). Otrzymano alkohol **113** zanieczyszczony niewielką ilością epimeru, przy wydajności 60% z α,β-nienasyconego ketonu **110**. Z alkoholu otrzymano azyrydynę **114**, a następnie pochodną pentanoksylową **115** w znany sposób. Celem zróżnicowania podstawników azotowych, usunięto obydwie grupy Boc, a następnie wybiórczo zabezpieczono grupę mniej osłanianą. Syntezę zakończyły etapy acetylowania, hydrolizy ugrupowania nitrylowego oraz utworzenie soli kwasu fosforowego.



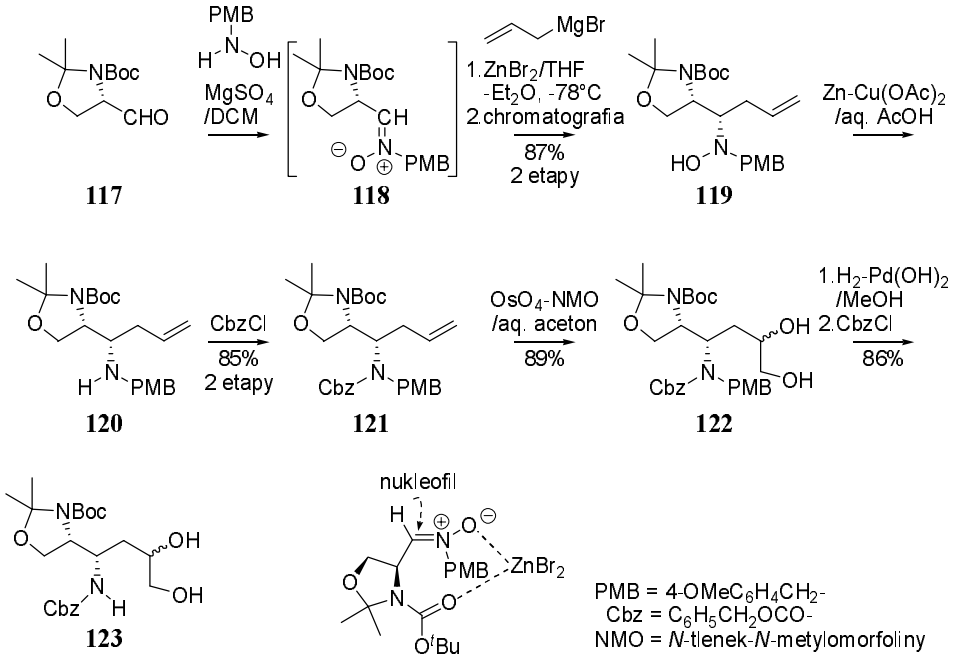
Schemat 24

SYNTEZA CONGA I YAO

Związkiem wyjściowym do syntezy opisanej przez Cong i Yao [51] z Chińskiej Akademii Nauk (Szanghaj) był stosunkowo łatwy do otrzymania z L-seryny (z wydajnością około 80%), lecz nietrwały tzw. aldehyd Garnera [52] **117** (Schemat 25).

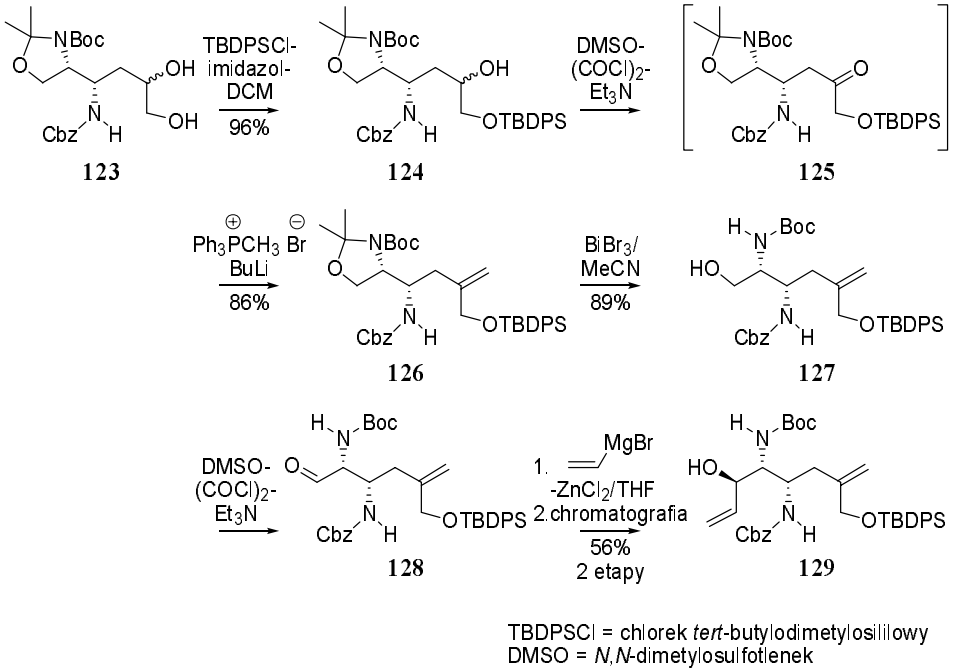
Kondensacja **117** z *N*-(4-metoksybenzylo)hydroksyaminą wobec siarczanu magnezu w suchym DCM prowadziła [53] do krystalicznego nitronu **118**. Ten ostatni związek, bez oczyszczania, poddano reakcji z bromkiem allilomagnezowym w obecności 1 równoważnika molowego bromku cynku w THF–eter w –70°C. Otrzymano dwa epimeryczne produkty, *syn* **119** i *anti* w stosunku 9.7:1. Uboczny produkt oddzielono chromatograficznie, otrzymując **119** z wydajnością 87%. Należy odnotować, że addycje różnych odczynników Grignarda do nitronu **118** przebiegają z utworzeniem *syn*-izomerów w przewadze [54]. Użycie chlorku cynku „utrwalającego" przeważającą konformację substratu i staranny dobór warunków reakcji (rozpuszczalnik, temperatura) pozwoliły otrzymać potrzebny izomer z bardzo dobrą wydajnością. Przypuszczalny model stereochemiczny tworzenia **119** przedstawiono w dolnej części Schematu 25. Przy ułożeniu ugrupowania nitronowego w płasz-

czyźnie rysunku kation cynkowy usztywnia konformację, a atak nukleofila następuje od najmniej osłanianej strony: spod płaszczyzny rysunku.



Schemat 25

Redukcja grupy hydroksyloaminowej w **119** i zabezpieczenie grupy aminowej doprowadziły do związku **121**, który poddano dihydroksylacji czterotlenkiem osmu (użytym w ilości katalitycznej) i *N*-tlenkiem morfoliny (Schemat 25). Kolejna „manipulacja" grupami ochronnymi dała wolną aminę i pochodną mono-benzyloksykarbonylową **123**.



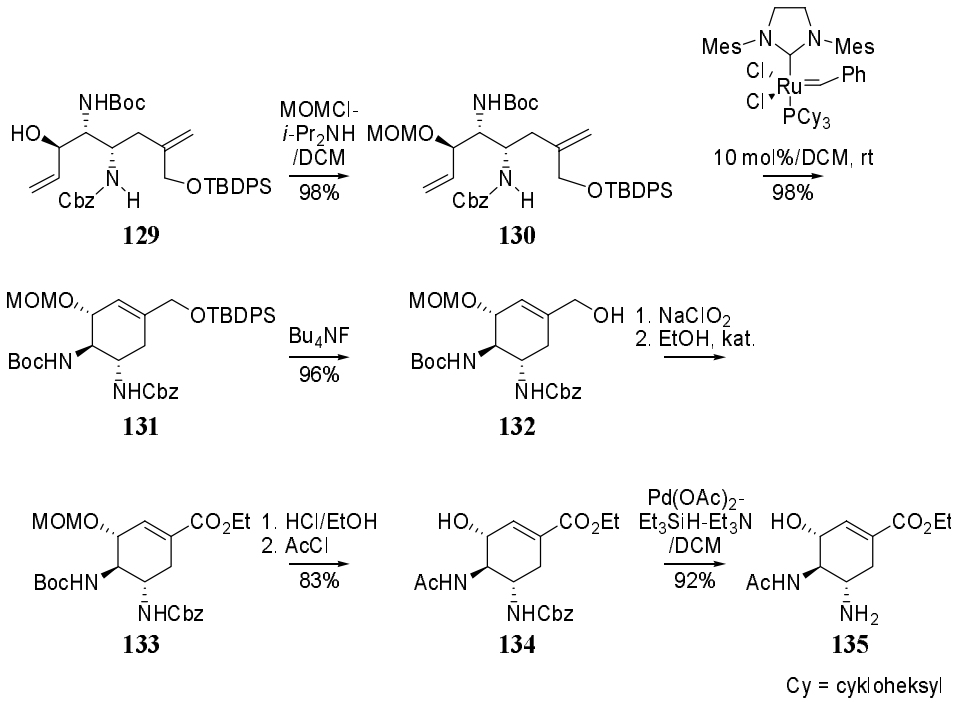
Schemat 26

Pierwszorzędową grupę hydroksylową w **123** zabezpieczono przestrzennie dużą grupą *tert*-butylodifenylosililową, a drugorzędową grupę hydroksylową utleniono według Swerna (DMSO–chlorek oksalilu–trietyloamina). Keton **125** poddano reakcji Wittiga, po czym selektywnie usunięto zabezpieczenie acetonidowe. Alkohol **127** utleniono, a uzyskany aldehyd **128** poddano reakcji z bromkiem winylomagnezowym w obecności bromku cynku. Główny produkt **129** oczyszczono chromatograficznie.

W tak otrzymanym 1,7-dienie **129**, przed reakcją metatezy, zabezpieczono jeszcze wolną grupę hydroksylową w postaci eteru metoksymetylowego (MOM) (Schemat 27). Związek **130** poddano działaniu katalizatora Grubbsa II generacji w chlorku metylenu w temperaturze pokojowej. Przy użyciu 10 mol% katalizatora i prowadzeniu reakcji w znacznym rozcieńczeniu (ca. 1 g/150 ml), cykliczny produkt **131** otrzymano z wydajnością 98%. Związek ten zawiera kompletny szkielet węglowy Tamiflu® i odpowiednie usytuowanie podstawników.

Usunięcie zabezpieczenia z pierwszorzędowej grupy hydroksylowej i utlenienie chlorynem w obecności buforów prowadziło do kwasu karboksylowego. Estryfikację surowego kwasu prowadzono z użyciem etanolu, 1-(3-dimetyloaminopropylo)-3-etylokarbodiimidu i DMAP, jako katalizatora. Po traktowaniu **133** 5% etanolowym chlorowodorem w temperaturze 0°C (usunięcie grup zabezpieczających: MOM i Boc) i acetylowaniu (AcCl/aq. Na_2CO_3) otrzymano acetamido-alkohol **134**. Ostatnim etapem w opisanej sekwencji reakcji było usunięcie zabezpieczającej

grupy benzyloksykarbonylowej w obecności wiązania etylenowego. Transformację tę prowadzono z użyciem trietylosilanu wobec katalitycznej ilości octanu palladu. Przekształcenie **135** w preparat Oseltamvir wymaga jeszcze wprowadzenia podstawnika pentylowego.



Schemat 27

Przedstawione prace otwierają nowy i ważny kierunek badań w dziedzinie syntezy totalnej. Ich technologiczne i ekonomiczne aspekty na pewno będą starannie analizowane przez producentów. Choć niekoniecznie: znana jest niechęć firm do zmiany raz wdrożonych technologii.

UWAGI KOŃCOWE

Czy Tamiflu® uchroni nas przed epidemią ptasiej grypy? Wynalezienie tego leku wymagało gruntownych badań podstawowych, a jego produkcja obejmuje wiele etapów. Te okoliczności muszą znaleźć odzwierciedlenie w cenie. Już przy pierwszych ustaleniach na wspomnianej konferencji WHO przewidywano trudności w zaopatrzeniu w Tamiflu® krajów uboższych. Roche deklarował, że krajom rozwijającym się dostarczy produkt w cenie 12 USD za kurację w stosunku do „normalnej" ceny 15 USD. Nieco wcześniej, w maju 2004, analityk Chemical and Engine-

ering News [1] szacował koszty kuracji Tamiflu® na 75 USD (dorosły pacjent) i 50 USD (dziecko). Według dr Macieja Kisiela, Głównego Inspektora Sanitarnego MSW, Tamiflu® stosuje się w dawkach 75 mg dziennie (1 tabletka) i może być podawany przez 6 tygodni. W Polsce Rada Ministrów na posiedzeniu w dniu 11 października 2005 r. uznała za niezbędne przeznaczenie środków finansowych na zakup strategiczny leku przeciwwirusowego na wypadek epidemii grypy. Tamiflu znajduje się w wolnej sprzedaży według cen ustalanych przez producenta i dystrybutorów. Obecnie w aptekach warszawskich cena 10 tabletek (po 75 mg) wynosi około 150 zł. W ciągu ostatniego roku odnotowano znaczny spadek ceny. Należy jednak wnioskować, że powszechne zaopatrzenie w Tamiflu® przy obecnej technologii jego wytwarzania będzie bardzo trudne.

Ocena zagrożenia wirusem grypy, w obliczu wielu innych zagrożeń i potrzeb służby zdrowia, należy do władz politycznych. Niewątpliwie, prace nad ulepszeniem i obniżeniem kosztów produkcji leków przeciw grypie nabrały pierwszorzędnego znaczenia. Śledząc imponujące osiągnięcia ostatnich kilku lat można mieć nadzieję, że dalsze postępy będą adekwatne do potrzeb.

Notka dodana przy okazji korekty: Od czasu wysłania manuskryptu do Redakcji ukazał się drukiem artykuł przeglądowy dotyczący metod syntezy Tamiflu (V. Farina, J.D. Brown, Angew. Chem. Int. Ed., 2006, **45**, 7330) oraz komunikaty przedstawiające ulepszenia syntezy Shibasaki (T. Mita, et al., Org. Lett., 2007, **9**, 259 i I. Fujimori, et al., J. Am. Chem. Soc. 2006, **128**, 16438).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] L.W. Dalton, Chemical & Engineering News, 2004, **82**, 45.
[2] G.T. Wang, Y.W. Chen, S. Wang, R. Gentles, T. Sowin, W. Kati, S. Muchmore, V. Giranda, K. Stewart, H. Sham, D. Kempf, W.G. Laver, J. Med. Chem., 2001, **44**, 1192.
[3] R.F. Service, Science, 1997, **275**, 756.
[4] K.G. Nicholson, Epidemiol. Infect., 1996, **116**, 51.
[5] T. Angata, A. Varki, Chem. Rev., 2002, **102**, 439.
[6] Science, 2006, **310**, 1103.
[7] Po raz pierwszy kwasy sialowe wydzielono ze śliny oraz z glikolipidów mózgu; gr. *sialos* – ślina.
[8] J. Varghese, N.W.G. Laver, P.M. Colman, Nature, 1983, **303**, 35.
[9] P.M. Colman, J.N. Varghese, W.G. Laver, Nature, 1983, **303**, 41.
[10] R.C. Wade, Structure, 1997, **5**, 1139.
[11] J.C. Dyason, M. von Itzstein, Aust. J. Chem., 2001, **54**, 663.
[12] K. Klumpp, B.J. Graves, Curr. Top. Med. Chem., 2006, **6**, 423.
[13] W.P. Burmeister, R.W. Ruigrok, S. Cusac, EMBO, 1992, **11**, 49.
[14] P. Bossart-Whitaker, M. Carson, Y.S. Babu, C.D. Smith, W.G. Laver, G.M. Air, J. Mol. Biol., 1993, **232**, 1069.
[15] M. von Itzstein, J.C. Dyason, S.W. Oliver, H.F. White, W.Y. Wu, G.B. Kok, M.S. Pegg, J. Med. Chem., 1996, **39**, 388.
[16] M. von Itzstein, W.Y. Wu, B. Jin, Carbohydr. Chem., 1994, **259**, 301.

[17] M. von Itzstein, B. Jin, W.Y. Wu, M. Chandler, Carbohydr. Chem., 1993, **244**, 181.
[18] M. von Itzstein, W.Y. Wu, G.B. Kok, M.S. Pegg, J.C. Dyason, B. Jin, T.V. Phan, M.L. Smythe, H.F. White, S.W. Oliver, P.M. Colman, J.N. Varghese, D.M. Ryan, J.M. Woods, R.C. Bethell, V.J. Hotham, J.M. Cameron, C.R. Penn, Nature, 1993, **363**, 418.
[19] M.J. Kiefel, M. von Itzstein, Prog. Med. Chem., 1999, **36**, 1.
[20] S. Sabesan, S. Neira, F. Davidson, J.O. Duus, K. Bock, J. Am. Chem. Soc., 1994, **116**, 1616.
[21] P. Meindl, G. Bodo, P. Palese, J. Schulman, H. Tuppy, Virology, 1974, **58**, 457.
[22] P.W. Smith, S.L. Sollis, P.D. Howes, P.C. Cherry, I.D. Starkey, K.N. Cobley, H. Weston, J. Scicinski, A. Merritt, A. Whittington, P. Wyatt, N. Taylor, D. Green, R. Bethell, S. Madar, R.J. Fenton, P.J. Morley, T. Pateman, A. Beresford, J. Med. Chem., 1998, **41**, 787.
[23] S. Singh, M.J. Jedrzejas, G.M. Air, M. Luo, W.G. Laver, W.J. Brouillette, J. Med. Chem., 1995, **38**, 3217.
[24] S. Ogawa, Y. M., T. Taki, Chem. Commun., 1992, 406.
[25] M. Chandler, R. Conroy, A.W.J. Cooper, R.B. Lamont, J.J. Scicinski, J.E. Smart, R. Storer, N.G. Weir, R.D. Wilson, P.G. Wyatt, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1995, 1189.
[26] C.U. Kim, W. Lew, M.A. Williams, H.T. Liu, L.J. Zhang, S. Swaminathan, N. Bischofberger, M.S. Chen, D.B. Mendel, C.Y. Tai, W.G. Laver, R.C. Stevens, J. Am. Chem. Soc., 1997, **119**, 681.
[27] Swoje prace chemicy Roche'a przedstawili w interesującym przeglądzie: S. Abrecht, P. Harrington, H. Iding, M. Karpf, R. Trussardi, B. Wirz, U. Zutter, Chimia, 2004, **58**, 621.
[28] D.A. McGowan, G.A. Berchtold, J. Org. Chem., 1981, **46**, 2381.
[29] G. Ulibarri, W. Nadler, T. Skrydstrup, H. Audrain, A. Chiaroni, C. Riche, D.S. Grierson, J. Org. Chem., 1995, **60**, 2753.
[30] T.K.M. Shing, Y. Tang, Tetrahedron, 1990, **47**, 6575.
[31] J.C. Rohloff, K.M. Kent, M.J. Postich, M.W. Becker, H.H. Chapman, D.E. Kelly, W. Lew, M.S. Louie, L.R. McGee, E.J. Prisbe, L.M. Schultze, R.H. Yu, L.J. Zhang, J. Org. Chem., 1998, **63**, 4545.
[32] B. Bartels, R. Hunter, J. Org. Chem., 1993, **58**, 6756.
[33] P.J. Harrington, J.D. Brown, T. Foderaro, R.C. Hughes, Org. Process Res. Dev., 2004, **8**, 86.
[34] F. Garro-Helion, A. Merzouk, F. Guibe, J. Org. Chem., 1993, **58**, 6109.
[35] M. Karpf, R. Trussardi, J. Org. Chem., 2001, **66**, 2044.
[36] A. Barco, S. Benetti, C. DeRisi, P. Marchetti, G.P. Pollini, V. Zanirato, Tetrahedron-Asymmetry, 1997, **8**, 3515.
[37] K.M. Draths, T.L. Ward, J.W. Frost, J. Am. Chem. Soc., 1992, **11**4, 9725.
[38] K.M. Draths, D.R. Knop, J.W. Frost, J. Am. Chem. Soc., 1999, **121**, 1603.
[39] D.R. Knop, K.M. Draths, S.S. Chandran, J.L. Barker, R. von Daeniken, W. Weber, J.W. Frost, J. Am. Chem. Soc., 2001, **123**, 10173.
[40] Y.Y. Yeung, S. Hong, E.J. Corey, J. Am. Chem. Soc., 2006, **128**, 6310.
[41] Y.Y. Yeung, X.R. Gao, E.J. Corey, J. Am. Chem. Soc., 2006, **128**, 9644.
[42] S. Itsuno, Y. Sakurai, K. Ito, A. Hirao, S. Nakahama, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1987, **60**, 395.
[43] E.J. Corey, R.K. Bakshi, S. Shibata, J. Am. Chem. Soc., 1987, **109**, 5551.
[44] D.J. Mathre, T.K. Jones, L.C. Xavier, T.J. Blacklock, R.A. Reamer, J.J. Mohan, E.T.T. Jones, K. Hoogsteen, M.W. Baum, E.J.J. Grabowski, J. Org. Chem., 1991, **56**, 751.
[45] E.J. Corey, Angew. Chem. Int. Edit., 2002, **41**, 1650.
[46] D.H. Ryu, E.J. Corey, J. Am. Chem. Soc., 2003, **125**, 6388.
[47] S. Knapp, A.T. Levorse, J. Org. Chem., 1988, **53**, 4006.
[48] Y. Fukuta, T. Mita, N. Fukuda, M. Kanai, M. Shibasaki, J. Am. Chem. Soc., 2006, **128**, 6312.
[49] T. Mita, L. Fujimori, R. Wada, J. Wen, M.L. Kanai, M. Shibasaki, J. Am. Chem. Soc., 2005, **127**, 11252.

[50] M. Kanai, N. Kato, E. Ichikawa, M. Shibasaki, Synlett, 2005, 1491.
[51] X. Cong, Z.J. Yao, J. Org. Chem., 2006, **71**, 5365.
[52] P. Garner, J.M. Park, J. Org. Chem., 1987, **52**, 2361.
[53] X. Cong, Q.J. Liao, Z.J. Yao, J. Org. Chem., 2004, **69**, 5314.
[54] P. Merino, A. Lanaspa, F.L. Merchan, T. Tejero, Tetrahedron-Asymmetry, 1998, **9**, 629.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 października 2006

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 1-2
PL ISSN 0043-5104

KOMPLEKSY PLATYNY(IV) JAKO POTENCJALNE ZWIĄZKI PRZECIWNOWOTWOROWE

PLATINUM(IV) COMPLEXES AS POTENTIAL ANTICANCER DRUGS

Michał Ciołkowski, Elżbieta Budzisz

Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych,
Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź

Abstract
Zestawienie użytych skrótów
Wstęp
1. Kompleksy platyny(IV) – informacje ogólne
2. Zależność „struktura – aktywność" związków platyny(IV)
3. Związki platyny(IV) objęte badaniami klinicznymi
4. Niestandardowe metody poszukiwania aktywnych kompleksów platyny(IV)
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. n. farm. Elżbieta Budzisz ukończyła studia na Wydziale Mat.-Fiz.-Chem. Uniwersytetu Łódzkiego. Po skończeniu studiów rozpoczęła pracę w Instytucie Podstawowych Nauk Chemicznych na Wydziale Farmaceutycznym w Łodzi, w zespole Prof. dr hab. Krzysztofa Kostki. W 1991 roku obroniła pracę doktorską, a w 2004 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych. Od 1 października 2005 roku jest kierownikiem Zakładu Chemii Surowców Kosmetycznych Katedry Kosmetologii na Wydziale Farmaceutycznym w Łodzi. Jest współautorem kilkunastu prac dotyczących syntezy i aktywności przeciwnowotworowej pochodnych chromonu, flawonu i kumaryny oraz ich kompleksów z wybranymi metalami. Obecnie zajmuje się syntezą kompleksów metali z pochodnymi chromonu o aktywności przeciwutleniającej.

Mgr farmacji Michał Ciołkowski w 2005 roku ukończył studia na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Tematem pracy dyplomowej było: *„Wiązanie fragmentu AFP (peptyd P149) oraz analogów morficeptyny z receptorami komórek raka sutka”*. Od listopada 2006 roku jest zatrudniony na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Surowców Kosmetycznych Katedry Kosmetologii na Wydziale Farmaceutycznym w Łodzi. Podjął prace badawcze nad syntezą kompleksów metali z pochodnymi chromonu oraz oceną ich właściwości przeciwutleniających i aktywności przeciwnowotworowej.

ABSTRACT

Cisplatin is an important anticancer drug. Unfortunately it does not bring satisfactory effects in all types of tumor. Other problems are its toxicity and intrinsic or acquired resistance of tumor cells. That is why new drugs based on this molecule are being searched.

One of the promising group of chemical compounds are neutral platinum(IV) complexes. They are more inert than platinum(II) complexes. In consequence their reactivity in bloodstream is weaker and more molecules can reach their target.

Many studies were done to establish the relation among the structure, lipophilicity, reduction potential and cytotoxicity of those complexes.

It is believed that platinum(IV) complexes must be reduced to platinum(II) complexes to obtain cytotoxicity. The speed of reduction depends on the nature of axial ligands. The complexes with chloride ligands are reduced the most quickly and complexes with hydroxide ligands are reduced the most slowly. *In vitro* cytotoxic activity of those complexes was shown to depend on their reduction potential. However suggestions exist that this result can be misleading for their *in vivo* activity, as platinum(IV) complexes are pro-drugs and might be inactive before reaching cancer cells.

In a study of group of platinum(IV) complexes, derivatives of cisplatin and dichloroethylenediamineplatinum(II), a tendency for an increase of cytotoxic activity when lipophilicity increased was observed. However in a study of tetrakis(carboxylato)(1,2-diaminocyclohexane)platinum(IV) complexes, different cytotoxic activity of complexes possessing similar lipophilicity was observed. Hence lipophilicity of complex is important but it is not the only factor that determines complex activity.

In other studies complexes of general structure *cis*, *trans*, *cis*-$[PtNH_3(RNH_2)Cl_2(OCOR')_2]$ were examined. The research showed an increased activity of compounds with longer carbon chains of carboxylate axial ligands. It was also revealed that complexes with alicyclic amine ligands were more cytotoxic than those with aliphatic or aromatic amine ligands.

Hall et al. revealed that platinum(IV) complexes, derivatives of cisplatin and dichloroethylenediamineplatinum(II), are active against DLD-1 colon cancer cell line in hypoxic environment.

An examination of *trans*-dichlorodihydroxo(dimethylamine)(isopropylamine)platinum(IV) revealed its greater cytotoxic activity against A2780, CH1 and 41M human ovarian cancer cell lines, *in vitro*. Moreover this complex was shown to be active against A2780cisR, CH1cisR and 41McisR human ovarian cell lines which are resistant to cisplatin.

Two platinum(IV) complexes: iproplatin (*cis*, *trans*, *cis*-dichlorodihydroxobis(isopropylamine)platinum(IV)) and tetraplatin (tetrachloro(cyclohexane-1,2-diamine)platinum(IV)) have had entered clinical trials. However iproplatin occurred to be less active than cisplatin and tetraplatin turned out to be neurotoxic. Presently two other complexes seem to be very promising: satraplatin (bis(acetato)amminedichlorocyclohexylamineplatinum(IV)) and adamplatin (bis(acetato)(1-adamantylamine)amminedichloroplatinum(IV)). Both have entered clinical trials.

There are some „nonstandard" approaches to investigating platinum complexes. For example platinum(IV) complexes with radioactive iodine isotope or with enzyme inhibitor were examined.

Studies mentioned above present different approaches to searching for anticancer drugs among platinum(IV) complexes. Despite all encountered difficulties during researching platinum(IV) complexes, this group of compounds still seems to be potential source of new anticancer drugs.

Keywords: platinum(IV) complexes, antitumor activity, SAR (structure – activity relationship)

Słowa kluczowe: kompleksy platyny(IV), aktywność przeciwnowotworowa, SAR

ZESTAWIENIE UŻYTYCH SKRÓTÓW

SAR	– zależność „struktura – aktywność”
dach	– 1,2-diaminocykloheksan
en	– etylenodiamina
OAc	– reszta kwasu octowego
OPr	– reszta kwasu propionowego
OPiv	– reszta kwasu trimetylooctowego
OTFAc	– reszta kwasu trifluorooctowego
IC_{50}	– stężenie badanego związku hamujące proliferację komórek o 50%
ED_{90}	– dawka badanego związku powodująca zmniejszenie guza o 90%
LD_{50}	– dawka badanego związku powodująca śmierć 50% zwierząt
RF	– współczynnik oporności (ang. *refractory factor*) obliczany jako stosunek wartości IC_{50} dla komórek opornych do wartości IC_{50} dla komórek wrażliwych
IT	– indeks terapeutyczny obliczany jako stosunek dawki powodującej śmierć 50% zwierząt (LD_{50}) do dawki powodującej zmniejszenie masy guza o 90% (ED_{90})
MCTS	– (ang. *multicellular tumor spheroids*) wielokomórkowe sferoidy tworzone w hodowli w celu naśladowania środowiska guzów nowotworowych
HMGB1a	– białko należące do rodziny HMG (ang. *high mobility group*) – niehistonowy składnik chromatyny
NF-*κB*	– (ang. *nuclear factor – kappaB*) jeden z jądrowych czynników transkrypcyjnych, zaangażowany w odpowiedź komórek na takie czynniki, jak stres, wolne rodniki i cytokiny
GSH	– glutation
GST	– grupa enzymów *S*-tranferaz glutationowych

WSTĘP

Cisplatyna (*cis*-diamminadichloroplatyna(II)) jest ważnym lekiem przeciwnowotworowym, mimo że jej skuteczność jest ograniczona tylko do niektórych rodzajów nowotworów (jąder, jajników, pęcherza, niedrobnokomórkowy rak płuc, guzy umiejscowione w głowie i szyi). Dodatkowo jej zastosowanie ogranicza pierwotna lub rozwijająca się w czasie stosowania oporność komórek nowotworowych oraz poważne efekty uboczne, które wywołuje u chorych (najsilniejsze z nich to nefrotoksyczność, neurotoksyczność, ototoksyczność, nudności i wymioty) [1–4]. Wydaje się, że głównym mechanizmem działania cisplatyny jest tworzenie wiązań z DNA i zaburzanie jego funkcji, co w efekcie prowadzi do apoptozy komórki [5].

U podstaw oporności na cisplatynę leżą następujące procesy:

– zmniejszenie kumulacji leku w komórce,

– zwiększenie dezaktywacji przez wiązanie z cząsteczkami zawierającymi grupy tiolowe (np. glutation, metalotioneina),

– zwiększenie natężenia procesów naprawczych DNA uszkodzonego przez addukty z cisplatyną,

– zwiększona tolerancja na addukty DNA z cisplatyną,

– osłabione mechanizmy kierujące komórkę na drogę apoptozy [2].

Powyższe czynniki, z jednej strony zmniejszają odpowiedź komórek nowotworowych na podaną dawkę leku (oporność), z drugiej zaś ograniczają tę dawkę (efekty uboczne). W usiłowaniu przezwyciężenia ograniczeń w stosowaniu chemioterapii opartej na cisplatynie konieczne stało się poszukiwanie nowych pochodnych platyny, które wykazywałyby przeciwnowotworowy efekt kliniczny. Nowe kompleksy platyny wyselekcjonowane w testach przesiewowych powinny, w porównaniu z cisplatyną, charakteryzować się następującymi właściwościami:

– mniejszą toksycznością dla organizmu przy zachowaniu toksyczności dla komórek nowotworowych,

– szerszym lub odmiennym spektrum aktywności przeciwnowotworowej,

– aktywnością w komórkach nowotworów opornych na cisplatynę,

– inną drogą podania, łatwiejszą w zastosowaniu niż wlew dożylny [1].

Klasą związków, która mogłaby spełniać powyższe wymagania, są kompleksy platyny(IV) [3]. Niniejszy artykuł prezentuje kierunki badań nad tymi kompleksami i ich zastosowaniem jako związków przeciwnowotworowych.

1. KOMPLEKSY PLATYNY(IV) – INFORMACJE OGÓLNE

Kompleksy platyny(IV) wykazujące symetrię oktaedryczną posiadają dwa aksjalne ligandy oraz cztery ligandy leżące w jednej płaszczyźnie, określane jako ekwatorialne. Związki platyny(IV), pośród których poszukuje się nowych leków przeciwnowotworowych, w pozycjach ekwatorialnych zawierają najczęściej dwie trwale związane cząsteczki amoniaku (jak w cisplatynie) lub pierwszo- albo drugorzędowe

aminy oraz dwie zdolne do wymiany grupy (aniony chlorkowe lub aniony kwasów karboksylowych albo dianiony kwasów dikarboksylowych). Wymiana ligandów anionowych na cząsteczki wody powoduje aktywację kompleksu i umożliwia oddziaływanie z DNA i innymi biocząsteczkami [5]. W pozycjach aksjalnych występują najczęściej jony chlorkowe, wodorotlenowe lub aniony kwasów karboksylowych.

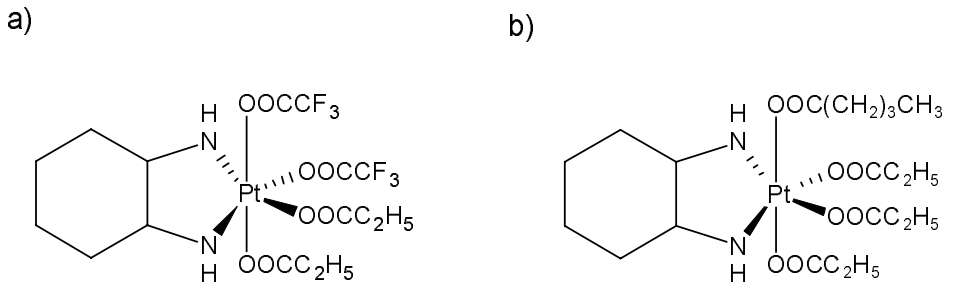
Związki platyny(IV) przejawiają, w porównaniu ze związkami platyny(II), pewne korzystniejsze właściwości. Kompleksy o liczbie koordynacyjnej sześć są trwalsze kinetycznie, a co za tym idzie, wolniej ulegają reakcjom podstawienia ligandów. W związku z tym, cząsteczki te w mniejszym stopniu będą reagować w krwiobiegu, dzięki czemu większa ich ilość może dotrzeć do komórek nowotworowych. Drugą zaletą kompleksów platyny(IV) jest to, że odpowiednio dobierając ligandy aksjalne można sterować ich lipofilnością, od której zależy zdolność przechodzenia przez błony komórkowe i w rezultacie – wchłanianie przez komórki [6].

Jak się przypuszcza, do uzyskania aktywności cytotoksycznej konieczna jest redukcja kompleksów platyny(IV) do odpowiadających im kompleksów platyny(II). Szybkość tej redukcji zależy od potencjału redukcyjnego kompleksu, a to z kolei jest w głównej mierze uwarunkowane charakterem ligandów w pozycji aksjalnej. Najwyższą wartością potencjału redukcyjnego (a zatem i największą szybkością redukcji) charakteryzują się kompleksy z anionami chlorkowymi. Pośrednie wartości charakteryzują kompleksy podstawione resztami kwasów karboksylowych (wydłużenie łańcucha nieznacznie podwyższa potencjał redukcji). Najtrudniej redukowane są związki z podstawnikami hydroksylowymi (Cl > RCOO > OH) [6].

2. ZALEŻNOŚĆ „STRUKTURA – AKTYWNOŚĆ" ZWIĄZKÓW PLATYNY(IV)

W wielu badaniach SAR („struktura – aktywność") próbowano ustalić zależności między budową cząsteczki kompleksu, jego lipofilowością, potencjałem redukcji i budową ligandów a aktywnością cytotoksyczną [3, 5, 7–10, 13].

Jedną z takich prób było znalezienie zależności pomiędzy cytotoksycznością a hydrofobowością (log P) kompleksów platyny(IV) z *trans*(±)-1,2-diaminocykloheksanem i różnymi ligandami karboksylowymi. Kompleksy te miały strukturę ogólną [Pt(dach)L_3L'] lub [Pt(dach)$L_2L''_2$], (gdzie: dach – *trans*-1,2-diaminocykloheksan; L – reszta kwasu octowego (OAc) lub propionowego (OPr); L' – reszta kwasu octowego, propionowego, walerianowego (OVal) lub trimetylooctowego (OPiv); L'' – reszta kwasu trifluorooctowego (OTFAc)). Spośród przebadanych kompleksów najwyższą aktywnością *in vitro*, w stosunku do komórek białaczki mysiej linii L1210, wykazały się dwa z nich: [Pt(dach)$(OPr)_2(OTFAc)_2$] (uzyskana wartość IC_{50} = 1,3 μM) oraz [Pt(dach)$(OPr)_3$(OVal)] (IC_{50} = 5,1 μM) (Rys. 1). Związkiem porównawczym w tym badaniu był związek JM216 (omówiony w dalszej części pracy), dla którego znaleziony parametr cytotoksyczności IC_{50} wynosił 1,2 μM [3].



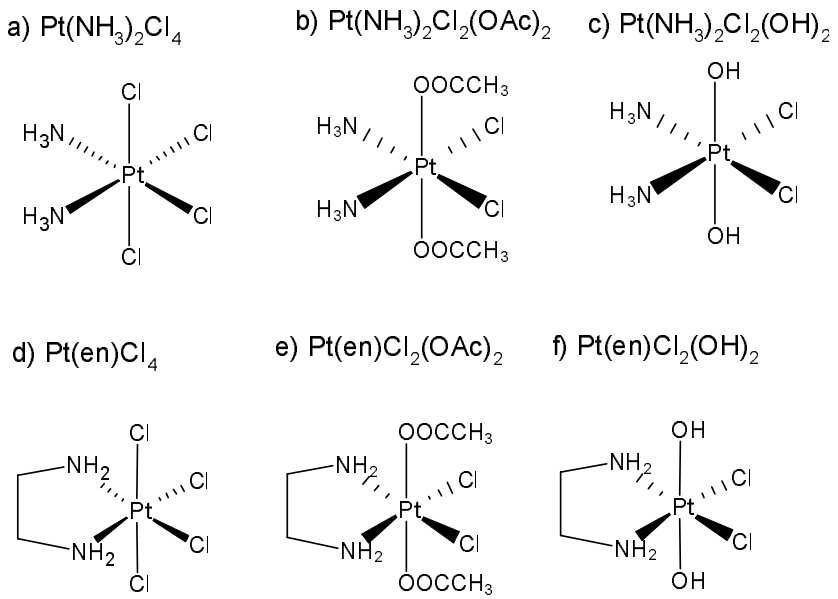
Rysunek 1. Cytotoksyczne kompleksy platyny(IV) z 1,2-diaminocykloheksanem: a) $[Pt(dach)(OPr)_2(OTFAc)_2]$; b) $[Pt(dach)(OPr)_3(OVal)]$ [3]

Obydwa kompleksy charakteryzują się podobną hydrofobowością (wartość log P odpowiednio 1,249 i 1,243). Jednakże inny kompleks o podobnej hydrofobowości ($[Pt(dach)(OPr)_3(OPiv)]$, log P = 1,213) wykazał dużo mniejszą aktywność (IC_{50} = 17,8 μM). Może to oznaczać, że parametr lipofilności kompleksu jest ważnym, ale nie jedynym czynnikiem warunkującym cytotoksyczność kompleksu [3].

Serię interesujących badań, pozwalających wnioskować o wpływie czynników strukturalnych na aktywność cytotoksyczną związków, przedstawia w swojej pracy przeglądowej Kostova [5]. W jednym z badań poddano ocenie 17 kompleksów o ogólnym wzorze *cis*, *trans*, *cis*-$[PtNH_3(RNH_2)Cl_2(OCOR')_2]$ (gdzie R – podstawnik alifatyczny lub alicykliczny; R' – podstawnik alifatyczny lub aromatyczny). Badania wykonano *in vitro* na komórkach mysiej białaczki linii L1210. Wykazano, że wraz ze wzrostem ilości atomów węgla (do pięciu) w alifatycznych podstawnikach aksjalnych (R'), rośnie cytotoksyczność kompleksów. Najsilniejszym działaniem charakteryzowały się jednak kompleksy z układem aromatycznym w położeniach aksjalnych, niezależnie od tego, czy grupa R była alifatyczna czy też alicykliczna [5].

W kolejnej pracy dotyczącej analogicznych kompleksów analizowano wpływ budowy ligandu aminowego na cytotoksyczność związków. Badania prowadzono na komórkach ludzkiego nowotworu jajnika (linie komórkowe: HX/62, SKOV-3, PXN/94, OVCAR-3, 41M oraz CH1). Najniższą cytotoksyczność wykazały związki z aminami aromatycznymi. Pochodne z aminami alifatycznymi charakteryzowały się wyższą cytotoksycznością, przy czym związki zawierające aminy z rozgałęzionym łańcuchem węglowym wykazywały silniejsze działanie od związków z łańcuchem nierozgałęzionym. Najaktywniejsze okazały się kompleksy z aminami alicyklicznymi. Ich cytotoksyczność rosła w miarę wzrostu wielkości pierścienia alifatycznego (od cyklobutanu do cykloheptanu) [7].

Badania SAR prowadzone przez Halla i in. dotyczyły dwóch serii kompleksów platyny(IV), pochodnych cisplatyny i dichloroetylenodiaminaplatyny ($[Pt(en)Cl_2]$) (Rys. 2). Kompleksy obu serii posiadały w pozycjach aksjalnych podstawniki hydroksylowe, chlorkowe lub reszty kwasu octowego [8].



Rysunek 2. Kompleksy platyny(IV), pochodne cisplatyny (a, b, c) i pochodne dichloroetylenodiaminaplatyny(II) (d, e, f): a) diamminatetrachloroplatyna(IV); b) diamminadichlorodioctanoplatyna(IV); c) diamminadichlorodihydroksoplatyna(IV); d) tetrachloro(etylenodiamina)platyna(IV); e) dichloro(etylenodiamina)dioctanoplatyna(IV); f) dichloro(etylenodiamina)dihydroksoplatyna(IV) [8]

W badaniach tych próbowano ustalić:
- zależność między potencjałem redukcji a cytotoksycznością,
- wpływ potencjału redukcji na wchłanianie związku przez komórki,
- wpływ podstawników aksjalnych na lipofilowość kompleksu,
- wpływ lipofilowości kompleksów na wchłanianie związku przez komórki.

W badaniach potencjału redukcji stwierdzono, że zależy on w głównej mierze od ligandów w pozycji aksjalnej. Analizowane związki uszeregowano pod względem wysokości potencjału redukcji (łatwości redukcji), w zależności od ligandu aksjalnego w następujący szereg (Cl > OAc > OH).

Cytotoksyczność związków była badana *in vitro* na trzech liniach komórek ludzkiego nowotworu jajnika (A2780, A2780R oraz A2780 473R). Aktywność cytotoksyczna kompleksów okazała się zależna od potencjału redukcji. Im wyższy potencjał (łatwiejsza redukcja), tym wyższą cytotoksyczność wykazywał związek. Jednakże autor zauważa, że iproplatyna, kompleks platyny(IV) o niskim potencjale redukcji, wykazuje dużą aktywność *in vivo*, co może sugeruje, że badanie toksyczności *in vitro* nie jest dobrą metodą selekcji kompleksów platyny(IV). Aktywność przeciwnowotworowa iproplatyny była tak wysoka, że została ona wyselekcjonowana do badań klinicznych, w których jednak okazała się mniej aktywna od cisplatyny i karboplatyny [6]. Przyczyną nieoczekiwanej aktywności *in vivo* hydroksylowych kompleksów Pt(IV) może być ich powolna redukcja, w wyniku której pow-

staje niewielka ilość reaktywnych cząsteczek Pt(II), a niezredukowana część ma szansę dotrzeć do komórki w postaci pro-leku. Kompleksy łatwiej ulegające redukcji tworzą formy zdolne do reakcji z różnymi cząsteczkami biologicznymi (np. albuminami w krwioobiegu) i w ten sposób zmniejsza się ich szansa wniknięcia do wnętrza komórki nowotworowej.

Eksperymenty dotyczące wchłaniania związków przez komórki przeprowadzono *in vitro* na liniach komórek ludzkiego nowotworu jajnika (A2780 i A2780R). Zaobserwowano analogiczną do aktywności cytotoksycznej zależność między wchłanianiem związku a jego potencjałem redukcji.

Analizując wpływ ligandów aksjalnych na lipofilowość kompleksów stwierdzono, że podstawniki hydroksylowe obniżają wartość log P (zwiększają hydrofilowość cząsteczki) kompleksu platyny(IV) w porównaniu z macierzystym kompleksem platyny(II). Podobny, lecz mniejszy wpływ wykazują ligandy chlorkowe. Aniony kwasów karboksylowych zwiększają lipofilowość cząsteczki (wpływ ten rośnie wraz ze wzrostem długości łańcucha).

Obserwowano tendencję do wzrostu wchłaniania kompleksów przez komórki przy wzroście log P. W celu zbadania charakteru tej zależności (liniowa, paraboliczna), należałoby przeprowadzić badania na związkach wykazujących większe różnice w lipofilowości [8].

Kolejna seria badań Halla i in. dotyczyła wpływu środowiska guza na działanie kompleksów platyny(IV) [9–10].

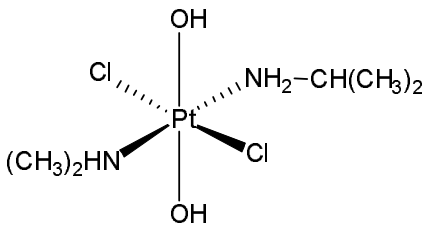
W jednym z eksperymentów badano między innymi aktywność kompleksów platyny(IV) pochodnych $[Pt(en)Cl_2]$ na wzrost komórek nowotworowych ludzkiego nowotworu jelita grubego linii DLD-1, tworzących *in vitro* sferoidy wielokomórkowe (ang. *multicellular tumour spheroids*, MCTS). Zaletą takiego systemu jest środowisko bardziej podobne do środowiska guza *in vivo* (hipoksja, występowanie zarówno komórek aktywnie dzielących się, jak i nieulegających podziałom). W badaniu tym wykazano opóźnione i mniejsze działanie na wzrost guza kompleksów platyny(IV), w porównaniu ze związkiem macierzystym. Największą aktywnością wykazał się kompleks $[Pt(en)Cl_4]$ a nieco mniejszą kompleks $[Pt(en)Cl_2(OH)_2]$. Kompleks $[Pt(en)Cl_2(OAc)_2]$ w najmniejszym stopniu hamował wzrost wielkości sferoidów. Wynika z tego, że w badaniu bardziej przypominającym warunki *in vivo* potencjał redukcji nie jest już głównym czynnikiem wyznaczającym aktywność kompleksów [9].

Porównywano również siłę działania cisplatyny i kompleksów platyny(IV) ($[Pt(NH_3)_2Cl_4]$, $[Pt(NH_3)_2Cl_2(OH)_2]$, $[Pt(NH_3)_2Cl_2(OAc)_2]$) w warunkach normoksji i hipoksji. Hipoksja środowiska, charakterystyczna dla guzów nowotworowych, może wpływać na aktywność związków platyny (zmniejszona jest koncentracja glutationu, ale zwiększa się ilość metalotioneiny oraz aktywność enzymów naprawiających DNA). Badanie przeprowadzono na komórkach ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc linii H226 oraz H520. Wykazano podobną efektywność tych kompleksów niezależnie od zawartości tlenu w środowisku, w którym hodowano komórki.

Aktywność związków była porównywalna, zarówno w „tradycyjnej" hodowli komórkowej, jak i dla komórek tworzących sferoidy [10].

W początkowych badaniach nad związkami platyny stwierdzono brak aktywności *trans*-diamminadichloroplatyny, co spowodowało, iż badacze skoncentrowali się głównie na kompleksach platyny o izomerii *cis*. Brak aktywności „transplatyny" może być spowodowany tworzeniem przez ten związek odmiennych, w porównaniu z cisplatyną, połączeń z DNA, które charakteryzują się inną budową przestrzenną. Różna jest również zdolność tych połączeń do oddziaływania z proteinami komórkowymi. W ostatnich latach wykazano, że modyfikacja „transplatyny" pozwala uzyskać związki o aktywności przeciwnowotworowej [11, 12]. Do tej grupy należą analogi „transplatyny", w których cząsteczkę (lub cząsteczki) amoniaku zastąpiono cząsteczką płaskiej aminy aromatycznej, alkiloaminy lub iminoeteru [5]. Również w grupie kompleksów platyny(IV) poszukuje się analogów „transplatyny" o wysokiej cytotoksyczności.

W kolejnym, przytaczanym przez autorów niniejszego opracowania badaniu, porównywano cytotoksyczność kompleksu *trans*-dichlorodihydrokso(dimetyloamina)(izopropyloamina)platyna(IV) (Rys. 3) z cisplatyną i macierzystym kompleksem platyny(II) [*trans*-dichloro(dimetyloamina)(izopropyloamina)platyna(II)] [13].



Rysunek 3. *Trans*-dichlorodihydrokso(dimetyloamina)(izopropyloamina)platyna(IV) [13]

Eksperymenty dotyczące cytotoksyczności *in vitro* przeprowadzono na trzech parach linii komórkowych ludzkiego nowotworu jajnika, zarówno wrażliwych, jak i opornych na cisplatynę (oznaczanych jako „cisR"): 41M / 41McisR, CH1 / CH1cisR oraz A2780 / A2780cisR.

W stosunku do linii komórkowych wrażliwych na cisplatynę, w zależności od zastosowanej linii komórkowej, kompleks platyny(IV) okazał się porównywalnie skuteczny z cisplatyną (linia A2780: IC_{50} dla badanego związku 5,7 μM, IC_{50} dla cisplatyny 4,0 μM) lub też od niej skuteczniejszy (linia CH1: IC_{50} dla badanego związku 7 μM, IC_{50} dla cisplatyny 13 μM; linia 41M: IC_{50} odpowiednio 23,5 μM oraz 56 μM). Macierzysty kompleks platyny(II) był aktywniejszy od kompleksu platyny(IV) jedynie w linii komórkowej 41M (wartości IC_{50}: linia komórkowa A2780 – 9,0 μM; linia CH1 – 19 μM; linia 41M – 13 μM).

Badania na liniach komórkowych opornych na cisplatynę wykazały większą skuteczność kompleksu platyny(IV) od cisplatyny (linia komórkowa A2780cisR:

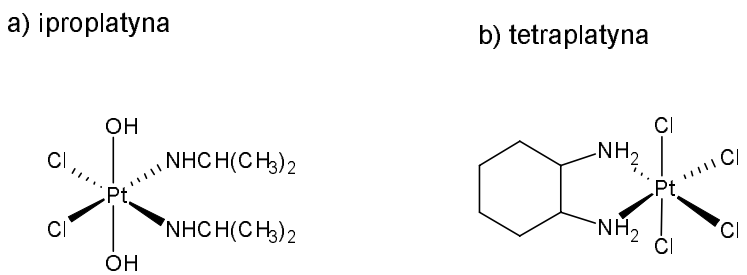
wartości IC_{50} dla kompleksu platyny(IV) 8,4 μM, dla cisplatyny 58 μM; linia CH1cisR odpowiednio 5,7 μM i 50 μM; linia 41McisR odpowiednio 1,3 μM i 128 μM). Kompleks macierzysty okazał się mniej aktywny (wartości IC_{50}: linia komórkowa A2780cisR – 57 μM, CH1cisR – 15 μM, 41McisR – 54 μM).

Żadna z linii komórkowych opornych na cisplatynę nie wykazała oporności na kompleks platyny(IV). W stosunku do macierzystego kompleksu jedynie komórki linii CH1cisR nie wykazały oporności.

Przeprowadzono również badanie zdolności związków do hamowania wzrostu guzów nowotworowych *in vivo* na myszach z wszczepionymi podskórnie fragmentami guza ludzkiego nowotworu jajnika linii CH1. Stwierdzono, że kompleks platyny(IV) wyraźnie hamował powiększanie guza, podczas gdy dla kompleksu macierzystego nie stwierdzono żadnej różnicy, w porównaniu z grupą kontrolną. Wynik badania może mieć związek z większą reaktywnością kompleksu platyny(II) i jego inaktywacją w środowisku biologicznym [13].

3. ZWIĄZKI PLATYNY(IV) OBJĘTE BADANIAMI KLINICZNYMI

Zanim zostaną zaprezentowane aktualnie badane związki, należy wspomnieć o dwóch pochodnych platyny(IV), które wykazywały dużą aktywność cytotoksyczną w badaniach przedklinicznych, jednak wyniki późniejszych badań klinicznych nie były zadowalające. Są to iproplatyna oraz tetraplatyna (ormaplatyna) (Rys. 4).



Rysunek 4. a) iproplatyna – *cis*, *trans*, *cis*-dichlorodihydroksobis(izopropyloamina)platyna(IV); b) tetraplatyna – (1,2-diaminocykloheksan)tetrachloroplatyna(IV) [1, 6]

Iproplatyna (*cis*, *trans*, *cis*-dichlorodihydroksobis(izopropyloamina)platyna(IV)) została wyselekcjonowana do badań w związku z wysoką rozpuszczalnością [2]. W eksperymentach *in vitro* stwierdzono porównywalną z cisplatyną aktywność iproplatyny wobec linii komórkowych mysiej białaczki P388 i mysiego czerniaka B-16 [14]. W badaniu *in vivo* na myszach szczepu NMRI z wszczepionym ludzkim nowotworem jądra (linie komórkowe wrażliwe na cisplatynę: H12.1, 2102EP i 1428A oraz linia komórkowa oporna na cisplatynę – H23.1) zaobserwowano mniejszą skuteczność iproplatyny od cisplatyny w stosunku do komórek wrażliwych na cispla-

tynę. W przypadku linii komórkowej opornej na cisplatynę, stwierdzono porównywalną, niewielką aktywność obydwu związków [15].

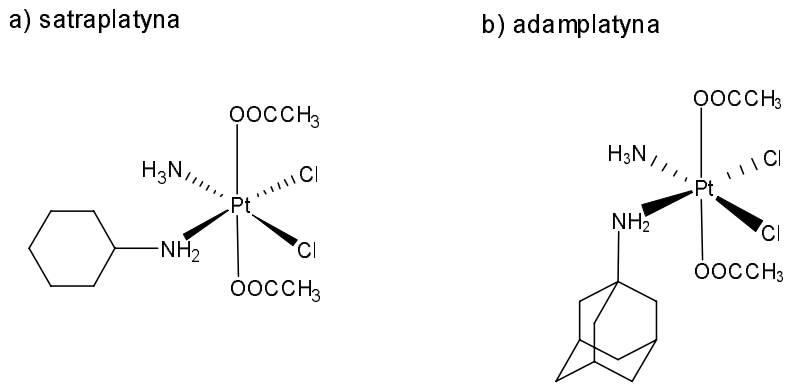
W pierwszej fazie badań klinicznych stwierdzono występowanie mielosupresji, jako najsilniej zaznaczonego efektu ubocznego. Nefrotoksyczność i ototoksyczność występowały rzadko [14].

Na początku drugiej fazy badań klinicznych stwierdzono, że iproplatyna posiada porównywalną z cisplatyną i karboplatyną skuteczność w leczeniu zaawansowanego nowotworu jajnika, jako lek pierwszego rzutu lub u pacjentów otrzymujących poprzednio leki niezawierające platyny. Zaobserwowano jednocześnie występowanie oporności krzyżowej z cisplatyną. W eksperymencie tym badano jednak wyłącznie iproplatynę i wyniki porównywano z wynikami innych eksperymentów dotyczących cisplatyny lub karboplatyny [16]. W trzeciej fazie badań klinicznych bezpośrednio porównywano skuteczność i toksyczność karboplatyny i iproplatyny w leczeniu nowotworu jajnika. Ta ostatnia okazała się mniej skuteczna (średnia przeżywalność pacjentów wynosiła 68 tygodni dla leczonych iproplatyną oraz 114 tygodni dla leczonych karboplatyną) i bardziej toksyczna [17].

W jednym z badań (druga faza badań klinicznych) porównywano skuteczność iproplatyny i karboplatyny w leczeniu guzów mózgu u dzieci. Stwierdzono dłuższy czas zahamowania wzrostu guza w przypadku początkowych stadiów glejaka u pacjentów leczonych karboplatyną (ponad 36 miesięcy w porównaniu z 7 miesiącami u pacjentów leczonych iproplatyną) [14]. W kolejnym badaniu skuteczności obydwu związków w leczeniu nowotworu szyjki macicy stwierdzono ich mniejszą skuteczność od cisplatyny [18]. Wyniki te spowodowały brak dalszego zainteresowania iproplatyną i niewprowadzenie jej do lecznictwa [1, 6].

Drugi z tych związków – tetraplatyna ((1,2-diaminocykloheksan)tetrachloroplatyna(IV)) – wykazywał wysoką cytotoksyczność w badaniach przedklinicznych. W badaniu *in vivo* na myszach (szczep CD2F1) z wszczepionymi komórkami mysiej białaczki (linia L1210) zaobserwowano zdolność tetraplatyny do 2–5 krotnego przedłużania życia zwierząt, w zależności od podanej dawki (dla porównania cisplatyna powodowała przedłużenie życia maksymalnie o 86%) [19]. Niestety w pierwszej fazie badań klinicznych zaobserwowano silną neurotoksyczność związku w stosunku do nerwów obwodowych i badania nad tym związkiem zostały przerwane [20].

Ostatnio duże nadzieje rokują dwa kolejne kompleksy platyny(IV): JM216 (satraplatyna – amminadichloro(cykloheksyloamina)dioctanoplatyna(IV)) oraz LA-12 (adamplatyna – (1-adamantyloamina)amminadichlorodioctanoplatyna(IV)) (Rys. 5).



Rysunek 5. a) satraplatyna – amminadichloro(cykloheksyloamina)dioctanoplatyna(IV); b) adamplatyna – dioctano(1-adamantyloamina)amminadichloroplatyna(IV) [4, 26]

Satraplatyna (JM216) jest preparatem podawanym doustnie. Wykazała ona porównywalną z cisplatyną cytotoksyczność *in vitro* w stosunku do 7 linii komórkowych ludzkiego nowotworu jajnika (HX/62, SKOV-3, PXN/94, OVCAR-3, A2780, 41M oraz CH1). Przeprowadzono również eksperyment *in vitro* mający na celu stwierdzenie występowania oporności krzyżowej z cisplatyną. Spośród użytych sześciu linii komórkowych opornych na cisplatynę (ludzkiego nowotworu jajnika: 41McisR, OVCAR-3cisR, CH1cisR oraz A2780cisR; ludzkiego nowotworu jądra GCT27cisR; ludzkiego nowotworu szyjki macicy HX/155cisR) dla trzech linii komórkowych wykazano brak oporności krzyżowej (linie 41McisR, OVCAR-3cisR oraz HX/155cisR).

Badanie aktywności *in vivo* na myszach z rakiem plasmocytoma (linia ADJ/PC6) wykazało wysoki indeks terapeutyczny satraplatyny IT po podaniu doustnym, wynoszący 56,9 (dla porównania wartość IT dla cisplatyny po podaniu dożylnym wyniosła 18, natomiast po podaniu doustnym – 5,8). W kolejnym badaniu *in vivo* na myszach z wszczepionym ludzkim nowotworem jajnika (linie komórkowe: PXN/109T/C, SKOV-3, OVCAR-3 oraz HX/110) stwierdzono skuteczność satraplatyny w hamowaniu wzrostu guza po podaniu doustnym, porównywalną ze skutecznością cisplatyny po podaniu dożylnym. W badaniach *in vivo* na myszach zaobserwowano mielosupresję. Nie stwierdzono ototoksyczności ani nefrotoksyczności [21].

Głównymi działaniami niepożądanymi, jakie zaobserwowano w badaniach klinicznych pierwszej fazy, były: mielosupresja (anemia, trombocytopenia, leukopenia), biegunka, nudności i wymioty [4]. W drugiej fazie badań klinicznych u pacjentów z drobnokomórkowym rakiem płuc, u których nie stosowano wcześniej chemioterapii, wykazano aktywność przeciwnowotworową tego związku, porównywalną z cisplatyną i karboplatyną. Główne działania uboczne były takie same jak zaobserwowane w badaniach pierwszej fazy. Autorzy badania sugerują konieczność przeprowadzenia oceny efektywności tego leku w terapii skojarzonej, ponieważ ten rodzaj terapii jest najefektywniejszy w drobnokomórkowym raku płuc [22].

Satraplatyna została wprowadzona do trzeciej fazy badań klinicznych, jako lek pierwszego rzutu u pacjentów z hormonoopornym rakiem prostaty. Zostało ono przerwane przez sponsora. Początkowe wyniki były dosyć pomyślne i aktualnie prowadzone jest badanie satraplatyny w połączeniu z prednizonem, jako leczenie drugiego rzutu u pacjentów z hormonoopornym rakiem prostaty, u których poprzednia chemioterapia zawiodła (badanie SPARC) [23, 24]. We wrześniu 2006 roku podano do wiadomości pierwsze wyniki tego badania. Wykazano obniżenie ryzyka progresji choroby o 40% u pacjentów otrzymujących satraplatynę i prednizon, w porównaniu z pacjentami otrzymującymi sam prednizon. Los wszystkich pacjentów będzie nadal śledzony, a pacjenci, u których nie stwierdzono progresji choroby będą kontynuować terapię. Wyniki badania dotyczące ogólnej przeżywalności będą znane prawdopodobnie pod koniec 2007 roku [25].

Drugim prezentowanym związkiem jest adamplatyna (LA-12), strukturalnie podobna do satraplatyny. Zawiera amantadynę, zamiast cykloheksyloaminy, jako grupę trwale związaną [26]. W badaniach *in vitro* na liniach komórkowych ludzkiego raka jajnika, zarówno wrażliwych (A2780), jak i opornych na cisplatynę (A2780cis, SK-OV-3), wykazano silniejsze cytotoksyczne działanie związku LA-12 od cisplatyny (wartości IC_{50} odpowiednio 6, 18 i 2,6 krotnie niższe dla związku LA-12, w porównaniu z cisplatyną). Stwierdzono również mniej zaznaczoną oporność komórek A2780cis w stosunku do LA-12 niż do cisplatyny (około trzykrotnie niższy współczynnik oporności RF dla związku LA-12, w porównaniu z cisplatyną) [2, 27]. Zaobserwowano 20–30 krotnie wyższy wychwyt związku LA-12 przez komórki nowotworowe linii A2780 i A2780cisR, w porównaniu z cisplatyną. W eksperymentach *in vitro* przy użyciu odwrotnej transkryptazy HIV-1 zaobserwowano, że addukty adamplatyny(II) („aktywnego metabolitu" związku LA-12) z DNA silniej hamują polimeryzację DNA, w porównaniu z adduktami cisplatyny z DNA. Jako że sekwencja i struktura wirusowych, prokariotycznych i eukariotycznych polimeraz DNA jest wysoce konserwatywna, wynik ten z wysokim prawdopodobieństwem można odnieść również do innych polimeraz DNA. Zaobserwowano ponadto tworzenie przez adamplatynę(II) monoadduktów z DNA, które utrzymują się dłużej niż podobne monoaddukty cisplatyny i w większym stopniu tworzą połączenia z proteinami. Obecność takich połączeń stwierdzono zarówno w badaniach *in vitro* przy użyciu DNA i protein takich jak HMGB1a lub NF-κB, jak i bezpośrednio na komórkach nowotworowych linii A2780 i A2780cisR. Mogą one w większym stopniu hamować polimeryzację DNA i zmniejszać szansę naprawy poprzez wycięcie nukleotydów. Wszystkie te czynniki mogą powodować silniejsze działanie związku LA-12, w porównaniu z cisplatyną, oraz większą wrażliwość komórek nowotworowych opornych na cisplatynę [28]. Związek znajduje się w pierwszej fazie badań klinicznych [26].

4. NIESTANDARDOWE METODY POSZUKIWANIA AKTYWNYCH KOMPLEKSÓW PLATYNY(IV)

Ostatnio są podejmowane inne próby projektowania aktywnych kompleksów platyny(IV).

Stwierdzono, że kompleksy platyny zwiększają wrażliwość komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące (efekt promieniouczulający). Jednoczesne zastosowanie chemioterapii takim związkiem, w połączeniu z radioterapią (napromieniowanie z zewnątrz lub poprzez podanie niewielkiej ilości izotopu promieniotwórczego do organizmu), może okazać się bardziej skuteczne niż zastosowanie każdej z tych metod leczenia osobno (efekt synergistyczny). W związku z tym, kompleksy platyny z radioaktywnymi ligandami mogą wykazać silne właściwości przeciwnowotworowe. W jednym z badań użyto kompleksu platyny(IV) ze znakowaną radioaktywnym jodem histaminą ($[Pt(IV)(Hist)_2(OH)_2]Cl_2$). W badaniu cytotoksyczności na komórkach ludzkiego raka piersi linii MCF-7 wykazano tylko nieznacznie mniejszą aktywność nowego kompleksu, w porównaniu z cisplatyną (IC_{50} odpowiednio 59 μM i 48 μM). Badania biodystrybucji przeprowadzono na myszach (podszczep C3H/W, u których spontanicznie rozwija się rak gruczołu piersiowego) z wszczepionym podskórnie rakiem gruczołu piersiowego i na zdrowych szczurach (szczep Wistar). Niestety, wykazały one wysokie gromadzenie się kompleksu w wątrobie i nerkach. Według autorów pracy, zastosowanie znakowania jodem radioaktywnym może być użyteczne przy badaniu farmakokinetyki nowych kompleksów platyny [29].

W innym eksperymencie badano cytotoksyczność kompleksu platyny(IV) z kwasem etakrynowym w pozycjach aksjalnych. Kwas etakrynowy jest inhibitorem *S*-transferaz glutationowych (GST), enzymów cytozolowych, katalizujących łączenie ksenobiotyków z glutationem (GSH). Zwiększenie inaktywacji cisplatyny poprzez łączenie z GSH jest jednym z postulowanych mechanizmów oporności. Fakt ten uzasadnia zaprojektowanie kompleksu platyny z inhibitorem GST. Redukcja kompleksu po wejściu do komórki powinna uwolnić aktywny kompleks platyny(II) oraz cząsteczki kwasu etakrynowego, hamujące GST i zmniejszające oporność komórki na działanie cytotoksyczne związku. Faktycznie w badaniach *in vitro* wykazano zdolność tego kompleksu do inhibicji GST, stwierdzono również większą cytotoksyczność, w porównaniu z cisplatyną, w stosunku do komórek nowotworowych ludzkiego raka piersi linii T47D. W przypadku innych linii komórkowych (ludzkiego raka piersi MCF-7, ludzkiego raka jelita grubego HT29, ludzkiego raka płuc A549), zaobserwowano szybsze hamowanie wzrostu (po ekspozycji trwającej 24 godziny), w porównaniu z cisplatyną, przy czym wartości IC_{50} po ekspozycji trwającej 72 godziny były porównywalne dla nowego kompleksu i cisplatyny [30].

Przeprowadzono również próby syntezy kompleksów platyny(IV) o niskiej toksyczności, które w docelowym miejscu działania mogą być aktywowane za pomocą światła widzialnego. Jednym z takich związków jest kompleks platyny(IV) z etylenodiaminą i jonami azydkowymi w pozycjach ekwatorialnych oraz jonami hydroksy-

lowymi w pozycjach aksjalnych $[Pt(en)(N_3)_2(OH)_2]$. Kompleks ten jest nieaktywny wobec DNA. Dopiero po naświetleniu światłem widzialnym wykazuje zdolność do tworzenia adduktów z DNA [31]. Związki tego typu mogą okazać się bardzo efektywne w terapii nowotworów skóry, ponieważ będą wykazywać niską toksyczność ogólną (brak aktywności wobec DNA bez naświetlenia) i aktywność cytotoksyczną wobec selektywnie naświetlonych komórek nowotworowych zewnętrznym źródłem światła.

PODSUMOWANIE

Eksperymenty dotyczące nowych pochodnych platyny, jako związków o działaniu przeciwnowotworowym, prowadzone są na całym świecie. Bada się wiele różnych związków, o bardzo zróżnicowanej budowie. Dużą uwagę poświęca się kompleksom platyny(IV), ze względu na wcześniej wymienione korzystne cechy w porównaniu z kompleksami platyny(II).

Z omówionych badań wynika, że projektując nowe kompleksy, dużą uwagę należy zwrócić na ligandy w pozycjach aksjalnych. Odpowiedni ich dobór pozwala uzyskać lipofilowość cząsteczki gwarantującą dobrą wchłanialność przez komórki, a jednocześnie odpowiednią rozpuszczalność związku. Dodatkowy ważny czynnik, również w dużej mierze zależny od ligandów aksjalnych, jakim jest potencjał redukcji, pozwala sterować reaktywnością kompleksu. Jest to ważne, ponieważ pozwala na zmniejszenie toksyczności dla organizmu. Jednocześnie należy pamiętać, że nadmierne obniżenie potencjału redukcji może spowodować utratę właściwości przeciwnowotworowych.

W projektowaniu kompleksów platyny(IV) daje się zauważyć nowe, odmienne podejście do zagadnienia. Chodzi tu o wspomniane już wykorzystanie promieniouczulających właściwości platyny i połączenie jej z radioaktywnym ligandem i o projektowanie związków aktywowanym światłem, co może mieć szczególne znaczenie w terapii nowotworów skóry. Bardzo interesujące wydaje się wykorzystanie faktu, że podczas redukcji do kompleksu platyny(II) ligandy aksjalne są odłączane, i zastosowanie inhibitora enzymu warunkującego oporność na związki platyny jako liganda. Nie należy również zapominać o kompleksach platyny o konfiguracji *trans*, wśród których również znaleziono związki o aktywności przeciwnowotworowej. Ich odmienna od cisplatyny budowa przestrzenna wymusza inny sposób wiązania z DNA, co może warunkować brak występowania oporności krzyżowej między nimi a cisplatyną.

Z przytoczonych przykładów wyłania się obraz wielu dróg poszukiwań nowych związków przeciwnowotworowych. Należy jednak pamiętać, że nawet bardzo obiecujące wyniki *in vitro* nie oznaczają jeszcze, że dany związek zostanie lekiem. Może się okazać, że aktywność przeciwnowotworowa u ludzi nie jest tak wysoka jak w modelach zwierzęcych lub w badaniach *in vitro*. Może się również okazać, że bardzo aktywny związek będzie powodował silne działania niepożądane i nie będzie mógł

być stosowany w lecznictwie. Mimo wszystkich przeszkód i trudności, nie należy porzucać badań nad potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi. Wśród testowanych związków kompleksy platyny(IV) wydają się być bardzo obiecującą grupą.

PODZIĘKOWANIE

Praca wykonana w ramach realizacji badań statutowych, projekt nr 503-3066-2, finansowanych przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] R.M. Roat-Malone, *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*, Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons Inc. Publication, 2002.
[2] V. Horvath, O. Blanarova, L. Svihalkova-Sindlerova, K. Soucek, J. Hofmanova, P. Sova, A. Kroutil, P. Fedorocko, A. Kozubik, Gynecol. Oncol., 2006, **102(1)**, 32.
[3] R. Song, S.Y. Park, Y. S. Kim, Y. Kim, S.J. Kim, B.T. Ahn, Y. S. Sohn, J. Inorg. Biochem., 2003, **96(2–3)**, 339.
[4] T. Kurata, T. Tamura, Y. Sasaki, H. Fujii, S. Negoro, M. Fukuoka, N. Saijo, Jpn. J. Clin. Oncol., 2000, **30(9)**, 377.
[5] I. Kostova, Recent Pat. On Anti-Cancer Drug Discovery, 2006, **1**, 1.
[6] M.D. Hall, T.W. Hambley, Coord. Chem. Rev., 2002, **232**, 49.
[7] L.R. Kelland, B.A. Murrer, G. Abel, Ch.M. Giandomenico, P. Mistry, K.R. Harrap, Cancer Res., 1992, **52**, 822.
[8] M.D. Hall, S. Amjadi, M. Zhang, P.J. Beale, T.W. Hambley, J. Inorg. Biochem., 2004, **98(10)**, 1614.
[9] M.D. Hall, C. Martin, D.J. Ferguson, R.M. Phillips, T.W. Hambley, R. Callaghan, Biochem. Pharmacol., 2004, **67(1)**, 30.
[10] H.R. Mellor, S. Snelling, M.D. Hall, S. Modok, M. Jaffar, T.W. Hambley, R. Callaghan, Biochem. Pharmacol., 2005, **70(8)**, 1137.
[11] S. Radulovic, Z. Tesic, S. Manic, Curr. Med. Chem., 2002, **9**, 1611.
[12] J. Kasparkova, V. Marini, Y. Najajreh, D. Gibson, V. Brabec, Biochemistry, 2003, **42**, 6321.
[13] J.M. Perez, L.R. Kelland, E.I. Montero, F.E. Boxall, M.A. Fuertes, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, Mol. Pharmacol., 2003, **63(4)**, 933.
[14] H.S. Friedman, J.P. Krischer, P. Burger, W.J. Oakes, B. Hockenberger, M.D. Weiner, J.M. Faletta, D. Norris, A.H. Ragab, D.H. Mahoney Jr., M.V. Whitehead, L.E. Kun, J. Clin. Oncol., 1992, **10**, 249.
[15] A. Harstrick, J. Casper, R. Guba, H. Wilke, H. Poliwoda, H.J. Schmoll, Cancer, 1989, **63**, 1079.
[16] C. Sessa, J. Vermorken, J. Renard, S. Kaye, D. Smith, W. ten Bokkel Huinink, F. Cavalli, H. Pinedo, J. Clin. Oncol., 1988, **6**, 98.
[17] C. Trask, A. Silverstone, C.M. Ash, H. Earl, C. Irwin, A. Bakker, J.S. Tobias, R.L. Souhami, J. Clin. Oncol., 1991, **9**, 1131.
[18] W.P. McGuire III, J. Arseneau, J.A. Blessing, P.J. DiSaia, K.D. Hatch, F.T. Given Jr., N.N.H. Teng, W.T. Creasman, J. Clin. Oncol., 1989, **7**, 1462.
[19] A. Rahman, J.K. Roh, M.K. Wolpert-DeFilippes, A. Goldin, J.M. Venditti, V. Woolley, Cancer Res., 1988, **48**, 1745.

[20] R.J. Schilder, F.P. Lacreta, R.P. Perez, S.W. Johnson, J.M. Brennan, A. Rogatko, S. Nash, C. McAleer, T.C. Hamilton, D. Roby, R.C. Young, R.F. Ozols, P.J. o'Dwyer, Cancer Res., 1994, **54**, 709.
[21] L.R. Kelland, G. Abel, M.J. McKeage, M. Jones, P.M. Goddard, M. Valenti, B.A. Murrer, K.R. Harrap, Cancer Res., 1993, **55**, 2581.
[22] E. Fokkema, H.J. Groen, J. Bauer, D.R. Uges, C. Weil, I.E. Smith, J. Clin. Oncol., 1999, **17(12)**, 3822.
[23] C.N. Sternberg, P. Whelan, J. Hetherington, B. Paluchowska, P.H. Th. J. Slee, K. Vekemans, P. Van Erps, C. Theodore, O. Koriakine, T. Oliver, D. Lebwohl, M. Debois, A. Zurlo, L. Collette, Oncology, 2005, **68**, 2.
[24] W. Berry, M. Eisenberger, Oncologist, 2005, **10 Suppl 3**, 30.
[25] http://www.gpc-biotech.com/en/news_media/press_releases/2006/09-24-2006.html; http://www.montagunewhall.com/news_archive/PharmionGPCBiotech.pdf
[26] P. Sova, J. Chladek, F. Zak, A. Mistr, A. Kroutil, M. Semerad, Z. Slovak, Int. J. Pharm., 2005, **288(1)**, 123.
[27] Kozubik, V. Horvath, L. Svihalkova-Sindlerova, K. Soucek, J. Hofmanova, P. Sova, A. Kroutil, F. Zak, A. Mistr, J. Turanek, Biochem. Pharmacol., 2005, **69(3)**, 373.
[28] J. Kašpárková, O. Nováková, O. Vrana, F. Intini, G. Natile, V. Brabec, Mol. Pharmacol., 2006, **70(5)**, 1708.
[29] P. Garnuszek, M. Maurin, J.S. Skierski, M. Koronkiewicz, J. Witowska-Jarosz, J. Inorg. Biochem., 2004, **98(3)**, 553.
[30] W.H. Ang, I. Khalaila, C.S. Allardyce, L. Juillerat-Jeanneret, P.J. Dyson, J. Am. Chem. Soc., 2005, **127(5)**, 1382.
[31] J. Kasparkova, F. S. Mackay, V. Brabec, P. J. Sadler, J. Biol. Inorg. Chem., 2003, **8**, 741.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 listopada 2006

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 1-2
PL ISSN 0043-5104

METODY OTRZYMYWANIA NIENATURALNYCH AMINOACYLO-tRNA

METHODS OF PREPARATION NON-NATURAL AMINOACYL-tRNA

Beata Plitta, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Jan Barciszewski

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Abstract
Wprowadzenie
1. Metody otrzymywania aminoacylo-tRNA
   1.1. Aminoacylacja z udziałem katalitycznych RNA
      1.1.1. Rybozym o aktywności aminoacylotransferazy (ATRib)
      1.1.2. Rybozym ATRib-QR
      1.1.3. Rybozym ATRib-tR
      1.1.4. Aminoacylacja z udziałem pre-tRNA
   1.2. Aminoacylacja chemiczna
      1.2.1. Aminoacylacja z wykorzystaniem AppA
      1.2.2. Aminoacylacja z wykorzystaniem dinukleotydów pCpA i pdCpA
      1.2.3. Kwas peptydonukleinowy
   1.3. Aminoacylacja z udziałem modyfikowanych syntetaz aminoacylo--tRNA
   1.4. Aminoacylacja pod wysokim ciśnieniem
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. Jan Barciszewski jest kierownikiem Pracowni Biochemii tRNA w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Opublikował ponad 270 oryginalnych prac naukowych. Jest również współautorem kilku patentów. Wypromował 9 doktorów.

Jego zainteresowania naukowe koncentrują się wokół zagadnień związanych z biochemią kwasów nukleinowych, wpływem wysokiego ciśnienia na cząsteczki biologiczne oraz oddziaływania w kompleksach białko–kwas nukleinowy. Prowadzi również badania nad molekularnymi markerami nowotworów oraz diagnostyką i leczeniem guzów mózgu z wykorzystaniem interferencji RNA. Osobny nurt działalności naukowej związany jest z biochemią urody.

Dr Małgorzata Giel-Pietraszuk ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pracę doktorską pt. „Analiza kompleksu 5S rRNA z fragmentami czynnika transkrypcyjnego IIIA z *Xenopus laevis*" obroniła w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN. Jest współautorką 22 prac naukowych.

Jej zainteresowania naukowe koncentrują się wokół zagadnień związanych z wpływem wysokiego ciśnienia na cząsteczki biologiczne i bakterie.

Mgr Beata Plitta jest absolwentką Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W 2006 r. obroniła pracę magisterską pt. „Aminoacylacja tRNA niebiałkowymi aminokwasami". Obecnie jest słuchaczką I roku studium doktoranckiego przy Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN.

ABSTRACT

Despite an enormous progress in the development of biophysical methods to establish protein structure and function, there is still a lack of precise ways of detection and mapping the specific fragments of molecules, in terms of their structure and properties. This is due to the fact that only a few amino acids show specific properties – like fluorescence of tryptophan – which enable analysis of the interaction and formation mechanism of protein – nucleic acids complexes. These problems one can easily overcome using proteins containing non-natural amino acid. However, all methods used in *in vitro* protein synthesis require up till now aminoacyl-tRNA as a substrate. Hence, the acylation of tRNA is a key and limiting step of every method. In the present article, we show all known non-enzymatical methods of tRNA acylation. One of them is based on ribozymes obtained by *in vitro* evolution (SELEX). These ribozymes that transfer amino acid bound to its 5'-end to 3'-end of tRNA can specifically recognize amino acid or tRNA. Other attempts aimed at chemical synthesis of aminoacyl-nucleotides, which were further ligated to appropriately prepared tRNA. As an amino acid donor, the peptidylnucleic acid (PNA) was used as well. An alternative method is an acylation under high hydrostatic pressure which allows to attach any amino acid to tRNA in a one-step procedure. All mentioned methods can be used in protein translation *in vitro*. For *in vivo* synthesis of protein containing non-natural amino acid, orthogonal pairs of tRNA-AARS are used. In orthogonal pairs mutated aminoacyl-tRNA synthetase recognizes specific amino acid and acylates suppressor amber tRNA.

Keywords: protein synthesis, tRNA aminoacylation, non-protein amino acids

Słowa kluczowe: synteza białka, aminoacylacja tRNA, niebiałkowe aminokwasy

WYKAZ SKRÓTÓW

AARS	– syntetaza aminoacylo-tRNA
AA-tRNA	– aminoacylo-tRNA
AppA	– P^1,P^2-bis-(5'-adenozyno)difosforan
ATRib	– (ang. *Acyl-Transferase Ribozyme*)
CME	– ester cjanometylowy
CTACl	– chlorek heksadecylotrimetyloamonowy
IGS	– (ang. *Internal Guide Sequence*), sekwencja przewodnika
NPS	– grupa *o*-nitrofenylosulfonylowa
pCpA	– cytydylo-adenozyno-5'difosforan
pdCpA	– 2'-deoksyrybocytydyloryboadenozyno-5'difosforan
PNA	– kwas peptydonukleinowy

WPROWADZENIE

Synteza białek jest jednym z głównych procesów zachodzących w komórkach organizmów żywych [1]. Przebiega ona na rybosomach, a podstawowymi jej substratami są aminoacylo-tRNA, w których tzw. białkowy aminokwas połączony jest wiązaniem estrowym z grupą hydroksylową przy końcu 3' tRNA. Reakcja estryfikacji tRNA katalizowana jest przez AARS w obecności ATP, jako donora energii. Wysoka specyficzność rozpoznawania aminokwasu i tRNA przez AARS jest gwarancją poprawności ekspresji informacji genetycznej. Właściwość ta zapobiega błędnej aminoacylacji, czyli związania aminokwasu innego niż homologiczny np. nienaturalnego analogu. Ogranicza to tym samym wykorzystanie acylacji enzymatycznej w procesie syntezy *in vitro* białek zawierających w swej sekwencji niebiałkowe aminokwasy [2].

Tabela 1. Przykłady zastosowań niektórych aminokwasów niebiałkowych [5]

Nienaturalny aminokwas	Zastosowanie
selenometionina tellurometionina *p*-bromofenyloalanina	badania krystolograficzne
4-fluorotryptofan 5-fluorotryptofan	nuklearny jądrowy rezonans magnetyczny (NMR)
homoallilglicyna	wprowadzenie grupy alkenowej do białka
p-acetylofenyloalanina	wprowadzenie grupy ketonowej do białka
β-tienopirylo alanina	wprowadzenie chromoforu do białka
aminotryptofan	wskaźnik pH
trifluoroleucyna	wzmocnienie efektu hydrofobowego
norleucyna pentafluorofenyloalanina	bakteriostatyk
p-benzofenyloalanina	wprowadzenie podstawnika do fotozszywania

Zastosowanie aminokwasów mających różne grupy fluorescencyjne i znaczniki spinowe, które pełnią rolę sond biofizycznych, w znacznym stopniu ułatwia oraz rozszerza możliwości analizy oddziaływań białko–białko w komórkach żywych [3].

Wprowadzenie pochodnych izoleucyny (allo-*O*-izoleucyny) i treoniny (allo-*O*-metylotreoniny) do sekwencji kanału jonowego receptora acetylocholinowego typu N (nAChR) umożliwiło ocenę wpływu hydrofobowych aminokwasów na mechanizm jego bramkowania, polegający na zwielokrotnieniu częstotliwości jego otwierania [4]. W innym przypadku wykorzystano modyfikowane aminokwasy do analizy miejsca wiązania agonisty receptora neurokininy-2, które określono przy udziale znaczonych fluorescencyjnie receptorów i wiążącej się z nimi, również znakowanej tachykininy [5]. Nienaturalne aminokwasy, zawierające grupę nitrylo-1-okso-2,2,5,5,-

-tetrametylopirolową, wprowadzane z wykorzystaniem supresji kodonu stop do sekwencji T_4 lizozymu, umożliwiły analizę jego struktury za pomocą elektronowego rezonansu paramegnetycznego (EPR) [5]. Obecność kwasu 2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oxo-4-amino-4-karbnyloooctowego (TOAC) w łańcuchu polipeptydowym powoduje usztywnienie jego struktury helikalnej, co pozwala na analizę fałdowania się białek metodą elektronowego rezonansu spinowego (ESR) [5]. Białka mające w swojej sekwencji modyfikowane aminokwasy stosowane są również jako skuteczne terapeutyki w medycynie. Dla przykładu: przyłączenie glikolu polietylenowego do cząsteczki interferonu α wydłuża jego okres półtrwania w krwi obwodowej oraz obniża jego immunogenność [5]. Zastąpienie fenyloalaniny allofenylonorstatyną w peptydzie będącym inhibitorem proteazy HIV zapobiega jego hydrolizie [6].

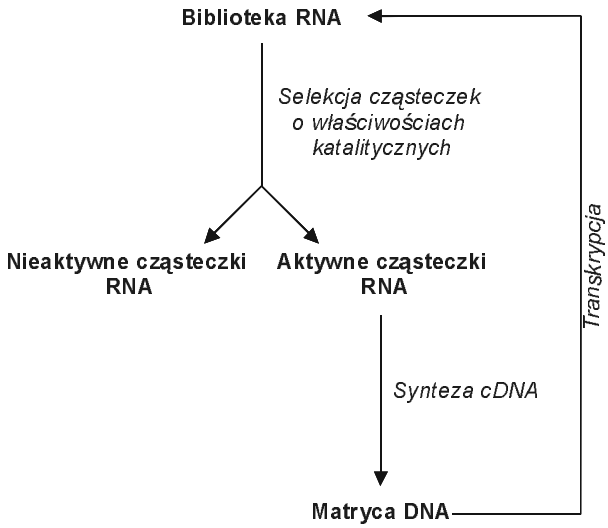
Jedną z pierwszych metod modyfikowania składu aminokwasowego białek była hodowla szczepów auksotroficznych na pożywkach bogatych w nienaturalny aminokwas, co prowadzi do jego wprowadzenia do proteomu. Po raz pierwszy wykorzystano ten sposób do zastąpienia metioniny w komórkach *E. coli* przez selenometioninę [7]. Z uwagi jednak na niekontrolowany sposób włączania modyfikowanych aminokwasów do białka, jak również otrzymywanie często letalnych dla bakterii jego form, metoda ta nie jest popularna. Innym sposobem jest synteza chemiczna na nośnikach stałych. W tym przypadku poważnym ograniczeniem jest jednak wielkość białka. Stosunkowo dogodnym sposobem jest chemiczna modyfikacja łańcuchów bocznych aminokwasów, np. alkilacja, fosforylacja czy acetylacja [8]. Jednakże z uwagi na to, że chemiczna synteza białek ma wiele ograniczeń, translacja *in vitro* nadal pozostaje najdogodniejszym sposobem ich uzyskania. Głównym problemem jest jednak pozyskanie podstawowego substratu, jakim jest aminoacylo-tRNA (aa-tRNA) [5].

W niniejszym artykule przedstawimy znane metody syntezy aminoacylo-tRNA, jako aktywnego substratu w syntezie białek *in vitro*.

1. METODY OTRZYMYWANIA AMINOACYLO-tRNA

1.1. AMINOACYLACJA Z UDZIAŁEM KATALITYCZNYCH RNA

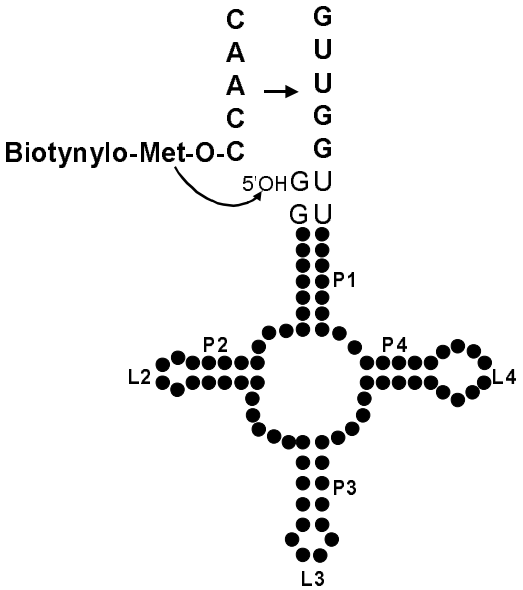
Odkrycie katalitycznych właściwości RNA [9,10] oraz rozwiązanie krystalicznej struktury rybosomu [11] pozwoliło na ugruntowanie hipotezy „świata RNA", zgodnie z którą pierwsza synteza białek odbywała się przy udziale RNA [12]. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że pierwotne cząsteczki RNA mogły wykazywać właściwości aminoacylotransferazy [13]. Nasunęło to pomysł wykorzystania ich do aminoacylacji tRNA. W celu otrzymania cząsteczek RNA katalizujących reakcję aminoacylacji wykorzystano metodę selekcji *in vitro* (SELEX) [14] (Rys. 1).



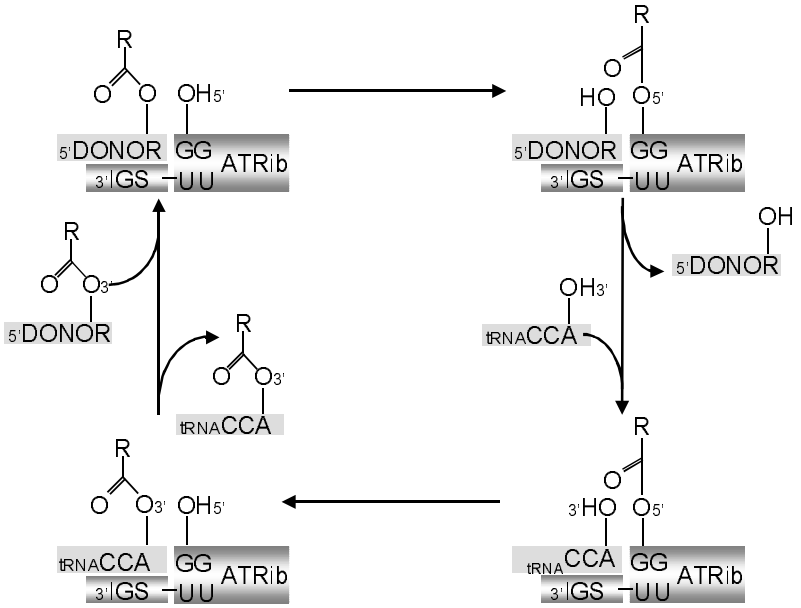
Rysunek 1. Schemat selekcji *in vitro* cząsteczek RNA o właściwościach acylotransferazy

1.1.1. Rybozym o aktywności aminoacylotransferazy (ATRib)

Rybozym o aktywności aminoacylotransferazy wyselekcjonowano z biblioteki RNA, zawierającej cząsteczki złożone ze 130 nukleotydów. Otrzymany RNA katalizował przeniesienie aminokwasu (*N*-biotynylo-L-metioniny) związanego z grupą 3'-OH 6-nukleotydowego donora o sekwencji 5'-CAACCA-3' na własną grupę 5'-OH (Rys. 2). Cząsteczki aktywnego rybozymu zawierały charakterystyczny 13-nukleotydowy fragment, którego 6 nukleotydów przy końcu 3' komplementarnych było do sekwencji oligonukleotydu będącego donorem aminokwasu, natomiast 7 pozostałych do końca 5' – rybozymu; dwie ostatnie pary G-U przy końcu były niesparowane. Fragment ten odgrywa, wg autorów pracy, rolę wewnętrznej matrycy, której zadaniem jest utrzymanie grupy aminoacylowej substratu w pobliżu końca 5' RNA [12]. W następnym etapie otrzymany rybozym skrócono o fragment sekwencji nieistotny dla jego aktywności katalitycznej. Struktura II-rzędowa nowej 82-nukleotydowej wersji ATRib składa się z 4 ramion (P1-P4) i trzech tzw. spinek do włosów (L2-L4), tworzących strukturę podobną do liścia koniczyny (Rys. 2) [14].



Rysunek 2. Schemat aminoacylacji rybozymu ATRib.
Pogrubioną czcionką zaznaczono sekwencję IGS, z którą oddziaływuje cząsteczka donora aminokwasu



Rysunek 3. Schemat reakcji aminoacylacji katalizowanej przez rybozym ATRib. W pierwszym etapie następuje związanie cząsteczki donora aminokwasu o sekwencji 5'CAACCA3' do fragmentu IGS rybozymu, a następnie przeniesienie aminokwasu na grupę 5'OH rybozymu i oddysocjowanie donora. W drugim etapie następuje asocjacja końca 3' tRNA z komplementarnego pentanukleotydu fragmentu IGS i przeniesienie aminokwasu na grupę 3'OH końcowej adenozyny tRNA.

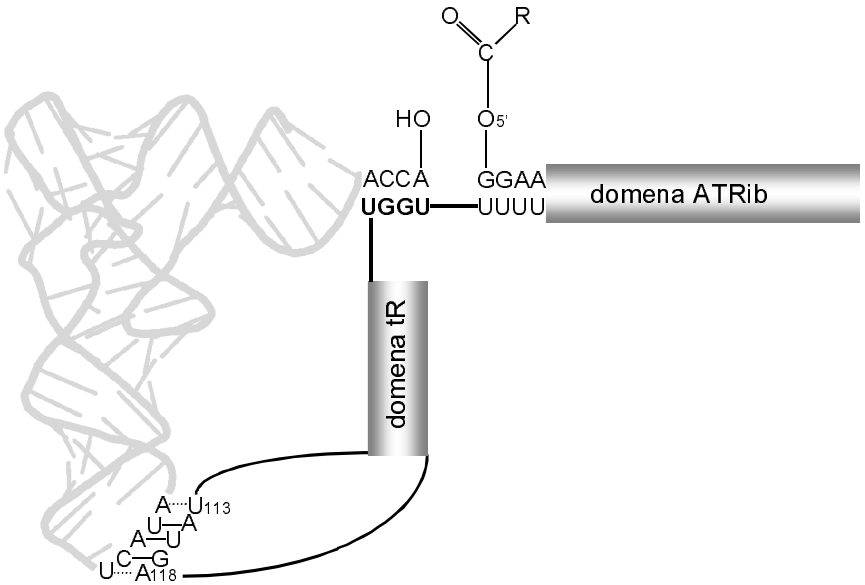
Przeniesienie aminokwasu na koniec 5' rybozymu jest procesem łatwo odwracalnym, co potwierdzono, wykorzystując ATRib katalizujący reakcję aminoacylacji cząsteczki akceptora komplementarnego do IGS o sekwencji 5'UGGUU3' (Rys. 3) [14]. Stwierdzono również, że ATRib katalizuje przeniesienie fenyloalaniny lub leucyny na $tRNA^{fMet}$ z prawie taką samą wydajnością jak metioniny, co świadczy o znikomym wpływie łańcuchów bocznych aminokwasów na specyficzność ich wiązania do rybozymu.

1.1.2. Rybozym ATRib-QR

Kolejnym etapem w poszukiwaniach skutecznej metody aminoacylacji była konstrukcja rybozymu o właściwościach aminoacylotransferazy, który specyficznie katalizuje acylację tRNA przy użyciu określonego, wolnego aminokwasu. W tym celu do selekcji wykorzystano mieszaninę cząsteczek RNA zawierającą ATRib, rozszerzony o 70 nukleotydowy fragment, stanowiący domenę rozpoznającą aminokwas biotynylo-L-Gln-CME (CME – grupa cjanometylowa) [14]. Otrzymany rybozym, nazwany AD02, katalizował aminoacylację tRNA przy użyciu glutaminy ze zdecydowanie wyższą wydajnością, w porównaniu do fenyloalaniny, leucyny i waliny. AD02 złożony jest z dwóch charakteryzujących się odmiennymi właściwościami domen ATRib i QR, połączonych penta- lub heksanukleotydem, złożonym z 5 lub 6 reszt adeninowych. Strukturę drugorzędową QR tworzą 3 ramiona zakończone pętlami, z których jedna zawiera sekwencję 5'UAACCA3' komplementarną do IGS ATRib. Oddziaływanie pomiędzy tymi sekwencjami prowadzi do utworzenia struktury pseudowęzła, niezbędnej w procesie autoaminoacylacji [14].

1.1.3. Rybozym ATRib-tR

Głównym celem poszukiwania rybozymów o właściwościach aminoacylotransferazy jest otrzymanie cząsteczek specyficznie acylujących syntetyczne tRNA za pomocą określonego niebiałkowego aminokwasu. W tym celu do selekcji wykorzystano bibliotekę RNA skonstruowaną jak w poprzednim eksperymencie [14]. Wyodrębniony rybozym składa się z dwóch domen ATRib (katalizuje przeniesienie aminokwasu) i tR, która rozpoznaje cząsteczkę tRNA. Sekwencja U113-A118 w domenie tR jest komplementarna do U33-A38 w pętli antykodonu tRNA będącego substratem (Rys. 4). Obie domeny połączone są pentanukleotydowym odcinkiem. Fragment rozpoznający tRNA (tR) ma prawdopodobnie kształt litery „Y", z jednym długim ramieniem (P5a, P5b, P5c) i dwoma ramionami zakończonymi pętlami P6, P7 i L6, L7 [15]. Otrzymany rybozym charakteryzował się wysoką specyficznością w stosunku do aminoacylowanego syntetycznego tRNA.



Rysunek 4. Struktura drugorzędowa rybozymu ATRib-tR.
Pogrubioną czcionką zaznaczono sekwencję IGS, RCO-aminokwas

1.1.4. Aminoacylacja z udziałem pre-tRNA

Dojrzałe cząsteczki tRNA w komórce powstają z prekursorowych (pre-tRNA) w wyniku działania RNazy P, która specyficznie hydrolizuje wszystkie pre-tRNA w odpowiednim miejscu, pomimo niewielkich różnic w sekwencjach wiodących przy końcu 5' [16]. Spostrzeżenie to nasunęło pomysł selekcji takich cząsteczek pre-tRNA, których sekwencja wiodąca miałaby właściwość katalizowania reakcji autoaminoacylacji w układzie *cis*, a po jej odcięciu za pomocą RNazy P – również w układzie *trans* [17]. Cząsteczki RNA, wykorzystane w tym eksperymencie, składały się z 70 nukleotydowego odcinka zmiennego przyłączonego do końca 5' supresorowego tRNA. Selekcji RNA o poszukiwanej aktywności dokonano wykorzystując ester *N*-biotynylo aminoacylocyjanometylowy (biotynylo-Phe-CME), jako donora aminokwasu [17]. Otrzymana cząsteczka RNA o aktywności acylotransferazy charakteryzowała się obecnością zasad G71 i G70 w sekwencji 5'-liderowej, komplementarnych do C74 i C75 z końca 3' tRNA. Ich obecność miała krytyczne znaczenie dla właściwości katalitycznych rybozymu [13, 17]. Otrzymany pre-tRNA wykazywał w porównaniu z innymi testowanymi biotynylo-aa-CME, dużą selektywność w stosunku do biotynylo-Phe-CME. Wykazano również, że elementem decydującym o specyficzności rozpoznawania fenyloalaniny był łańcuch boczny aminokwasu [17].

W celu usprawnienia procedury aminoacylacji oraz podniesienia jej wydajności, liderowy fragment (89 nukleotydów) cząsteczki pre-tRNA, który po hydrolizie

za pomocą RNazy P wykorzystany był jako katalizator w układzie *trans*, związano z nośnikiem stałym (dihydrazyd kwasu adypinowego) i umieszczono na kolumnie. W tym przypadku substratami również były estry cyjanometylowe aminokwasów. W dalszych badaniach cząsteczka katalityczna została skrócona do 57 nukleotydów, tworząc ostateczną formę r24mini. Do końca 3' tego rybozymu przyłączono łącznik zbudowany z 20 reszt adenozynowych, zapobiegający oddziaływaniu nośnika na strukturę i funkcję rybozymu. Przyłączenie rybozymu do nośnika umieszczonego w kolumnie pozwala na łatwą izolację produktu aminoacylo-tRNA oraz kilkakrotne wykorzystanie immobilizowanych rybozymów [18].

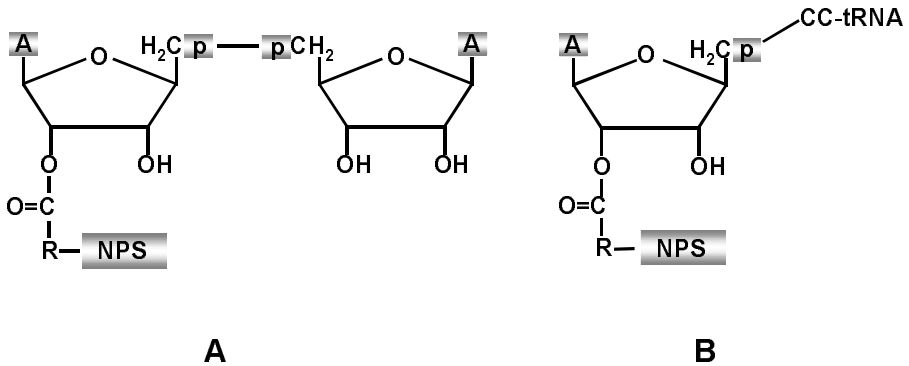
1.2. AMINOACYLACJA CHEMICZNA

Aminoacylacja chemiczna polega na syntezie aminoacylo-*n*-nukleotydu, który następnie jest przyłączany do skróconej o *n* (*n* = 1–3) nukleotydów przy końcu 3' cząsteczki tRNA. W tej metodzie wykorzystuje się fakt, że wszystkie tRNA posiadają wspólną sekwencję CCA przy końcu 3' [19, 20]. Nie używa się całej cząsteczki tRNA z uwagi na bardzo dużą liczbę miejsc reaktywnych, tRNA pozbawiony nukleotydów przy końcu 3' uzyskiwany jest metodą transkrypcji *in vitro*. Do tak przygotowanej cząsteczki przyłącza się aminoacylo-*n*-nukleotyd (aa-*n*N) z użyciem ligazy RNA. W syntezie aa-*n*N konieczne jest zablokowanie grupy aminowej poprzez przyłączenie grup ochronnych, co zapobiega chemicznej hydrolizie wiązania estrowego pomiędzy aminokwasem a nukleotydem oraz polimeryzacji aminokwasów w czasie aktywacji grupy karboksylowej [21]. Do chwili obecnej wykorzystuje się różne warianty aminoacylo-nukleotydów.

1.2.1. Aminoacylacja z wykorzystaniem AppA

W pierwszych próbach syntezy aminoacylo-dinukleotydu wykorzystywano AppA otrzymywany w wyniku kondensacji soli amonowej adenozyno-5'monofosforanu, który następnie poddawany był estryfikacji przy użyciu waliny, której grupa aminowa została zablokowana za pomocą grupy *o*-nitrofenylosulfonylowej (NPS) [20]. Tak otrzymany substrat, NPS-walino-difosforan dinukleozydu (Rys. 5A), przyłączono za pomocą ligazy T4 RNA do tRNA pozbawionego A76 ($tRNACC_{(75)}$-OH) tworząc walino-tRNA (Rys. 5B). Wydajność tej reakcji waha się między 38% a 79%, w zależności od użytego tRNA (mieszania tRNA z *E. coli*, $tRNA^{Phe}$ z drożdży) oraz aminokwasu (walina, fenyloalanina). [20]. Wadą tej metody jest konieczność użycia ok. dwustukrotnego nadmiaru aminoacylowanych dinukleotydów, przy czym zarówno zwiększenie stężenia reagentów, jak i enzymu nie wpływa znacząco na efektywność tego procesu. Dodatkową niedogodnością jest niespecyficzna aminoacylacja w przypadku stosowania mieszaniny tRNA [20]. Chemiczna aminoacylacja nie

może być także stosowana *in vivo*. Fakt ten zainicjował rozwój badań, mających na celu poprawienie efektywności tej metody.



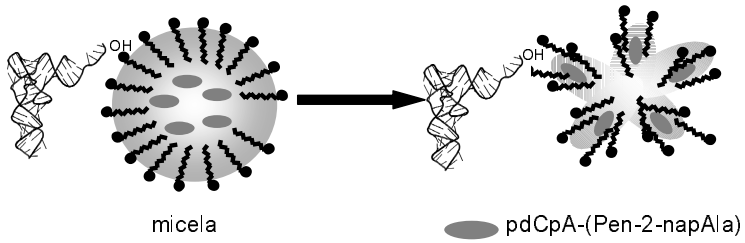
Rysunek 5. Schemat substratu i produktu w reakcji chemicznej aminoacylacji.
A – NPS-aminoacylo-AppA; B – NPS-aminoacylo-tRNA; RCO – aminokwas; A – adenina; p – grupa fosforanowa

1.2.2. Aminoacylacja z wykorzystaniem dinukleotydów pCpA i pdCpA

Poszukując bardziej efektywnych sposobów chemicznej aminoacylacji zastosowano tRNA pozbawiony dwóch ostatnich nukleotydów przy końcu 3' ($tRNAC_{(74)}$-OH) oraz syntetycznie otrzymany aminoacylo-pCpA [19,22]. Substratami reakcji są pCpA oraz aminokwasy z grupą aminową blokowaną przez grupę acetylową (Ac) uaktywnione wcześniej za pomocą carbonylodiimidazolu (CDI). Pierwszym etapem tej reakcji jest synteza 5'-pCpA-3'-OH. Z uwagi na to, że produkt musi mieć odpowiednią orientację 3'→5' niezbędne jest zablokowanie grup reaktywnych nukleotydów (5'-OH, 4-NH_2 i 2'-OH cytydyny oraz 6-NH_2 i 2',3'-OH adenozyny), a następnie ich odblokowanie. Początkowo w reakcji kondensacji pCpA i aminokwasu użyto dinukleotydu z niezablokowaną egzocykliczną grupą aminową cytydyny, co wiąże się z koniecznością uwodornienia tej grupy, w celu usunięcia związanego aminokwasu. Dodatkową niedogodnością tej metody jest diaminoacylacja adenozyny [25]. Otrzymany produkt łączy się z $tRNAC_{(74)}$-OH za pomocą ligazy T_4 RNA; wydajność tego ostatniego procesu waha się między 20–65% dla dwudziestokrotnego nadmiaru aminoacylowanego dinukleotydu [19, 22]. Możliwość wykorzystania tak aminoacylowanego tRNA przez peptydylotransferazę została potwierdzona w procesie translacji *in vitro* na matrycy poli-U [22]. Z uwagi jednak na acylację grupy aminowej *N*-Ac-aminoacylo-tRNA, nie można użyć w syntezie polipeptydu. Trudność ta została pokonana dzięki zastosowaniu innych grup blokujących, jednak deprotekcja grupy aminowej aminokwasu kształtuje się na poziomie 14%, co przy wydajności acylacji pCpA rzędu 3–4%, czyni tę metodę mało atrakcyjną [23, 24]. Zastosowanie deoksycytydyny w reakcji kondesacji pdC i pA pozwoliło na pominięcie etapu blo-

kowania grupy 2'-OH cytydyny, a tym samym na zwiększenie wydajności kondensacji [24].

Wydajność metody chemicznej podniesiono wykorzystując micele [25]. W tej metodzie wykorzystano aminokwasy z hydrofobową grupą ochronną, np. Pen-2-nap--Ala-OCM (cjanometylo-*N*-pentylo-L-2-naftyloalanina, ang. *N-pentenoyl-L-2-naphthylalanine*) zawieszone w dodatnio naładowanym micelarnym roztworze CTACl (chlorek heksadecylotrimetyloamonowy) oraz pdCpA.

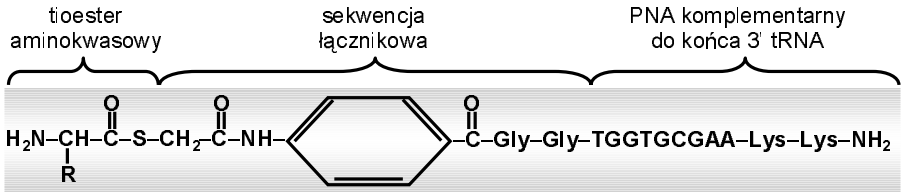


Rysunek 6. Schemat aminoacylacji z użyciem miceli.

Grupy fosforanowe pdCpA posiadające ładunek ujemny oddziałują z dodatnio naładowanymi cząsteczkami CTACl, dzięki czemu grupy 2'(3')-OH adenozyny gromadzą się na zewnątrz miceli. Miejscowy wzrost stężenia grup –OH ułatwia ich acylację. Otrzymany produkt, pdCpA-(Pen-2-napAla), ligowany jest następnie do $tRNAC_{(74)}$-OH [25]. Metodę micelarną można wykorzystać do bezpośredniej aminoacylacji tRNA (bez wykorzystania ligazy), poddając roztwór działaniu ultradźwięków. Aminoacylo-tRNA przygotowany tą metodą był aktywnym substratem w syntezie polipeptydu [26].

1.2.3. Kwas peptydonukleinowy

Kwas peptydonukleinowy (PNA) jest cząsteczką przypominającą kwas nukleinowy, w której szkielet fosforanowo-cukrowy RNA zastąpiono pozbawionym ładunku poliamidem, złożonym z podjednostek *N*-(-2-aminoetylo)-glicyny, połączonych wiązaniem peptydowym. Cząsteczki PNA rozpoznają tRNA na zasadzie komplementarności, tworząc z nim dupleksy i tripleksy stabilniejsze niż kompleksy oligonukleotyd-tRNA [27]. Trwałość tych struktur wynika z braku odpychania pomiędzy nicią kwasu nukleinowego a PNA [28]. Tę właściwość wykorzystano do opracowania metody aminoacylacji, w której zastosowano cząsteczki PNA składające się z 3 elementów. Pierwszy z nich to 9-nukleotydowy *N*-końcowy odcinek PNA komplementarny do końca 3' tRNA. Drugim elementem jest sekwencja łącznikowa, zaprojektowana tak, aby utrzymać grupę tioestrową blisko grupy hydroksylowej 3' końcowej adenozyny tRNA. Trzeci element stanowi tioester aminokwasu (Rys. 7) [27].



Rysunek 7. Schemat PNA zastosowanego do reakcji aminoacylacji

Wiązanie PNA do specyficznego tRNA musi być efektywne, ale niezbyt silne, ze względu na możliwość blokowania aminoacylo-tRNA przez związaną cząsteczkę PNA [27]. Pokazano, że w syntezie białka z wykorzystaniem systemu translacyjnego *E. coli* najbardziej efektywne są 9-nukleotydowe odcinki. Wynika to z faktu, że temperatura topnienia dupleksu wynosi 38±2°C [27]. Wydajność reakcji aminoacylacji z zastosowaniem cząsteczek PNA wynosiła 39–54(±5)%. Zmniejszenie wydajności procesu spowodowane było wolną grupą SH, powstającą po wymianie estrowej, która katalizuje hydrolizę aminoacylo-tRNA [27].

1.3. AMINOACYLACJA Z UDZIAŁEM MODYFIKOWANYCH SYNTETAZ AMINOACYLO-tRNA

W syntezie białek *in vivo*, zgodnie z kodem genetycznym, 20 podstawowych aminokwasów, przypisanych kodonom typu sens, jest rozpoznawanych przez specyficzne syntetazy (AARS), które następnie katalizują ich przeniesienie na odpowiednie cząsteczki tRNA [29]. Pomysł wprowadzenia niebiałkowych aminokwasów oraz ich analogów w określone pozycje w białkach dał początek koncepcji ortogonalności [5]. Polega ona na skonstruowaniu AARS, która rozpoznaje nienaturalny aminokwas oraz odpowiedni supresorowy tRNA. Warunkiem jest brak oddziaływań tej syntetazy z innymi cząsteczkami tRNA, oraz to aby supresorowy tRNA rozpoznający kodon amber był aktywny w procesie translacji [30]. Z uwagi na wysoką specyficzność oddziaływania pomiędzy tRNA i syntetazą, otrzymanie ortogonalnej pary, aktywnej w translacji, jest procesem niezwykle pracochłonnym. Do tworzenia takich par stosuje się supresorowy tRNA i odpowiednio zmutowaną syntetazę aminoacylo-tRNA. Aktywność AARS modyfikuje się odpowiednio mutując sekwencję kodującą miejsce oddziaływania syntetazy z tRNA. Inna strategia polega na wprowadzaniu do komórki par tRNA–AARS pochodzących z innego organizmu. W tym przypadku jest ważne, aby wprowadzany tRNA nie był aminoacylowany przez syntetazę gospodarza, a syntetaza nie aminoacylowała tRNA gospodarza.

Kolejna stosowana metoda opiera się na zastosowaniu syntetazy aktywnej wobec zmutowanego tRNA, pochodzącego z tego samego bądź spokrewnionego organizmu [31]. Chociaż niektóre nienaturalne aminokwasy o strukturze zbliżonej do naturalnych mogą ulegać niespecyficznej aktywacji, odpowiednio zaprojekto-

wane mutacje w enzymach są niezbędne dla preferencyjnej aktywacji analogów o skomplikowanym łańcuchu bocznym. Metoda wprowadzania mutacji w AARS pozwala na wielokrotne wykorzystywanie cząsteczek supresorowego tRNA. Oszacowano, że pojedyncza cząsteczka tRNA może uczestniczyć więcej niż 2 razy w procesie syntezy białek z nienaturalnymi aminokwasami [29].

Alternatywą dla pracochłonnych i kosztownych metod otrzymywania ortogonalnych par syntetaza-tRNA jest metoda projektowania ich *in silico* (ang. *clash opportunity progressive*, COP). Procedura ta jest stosowana do przewidywania struktury miejsca preferencyjnego wiązania nienaturalnego substratu w oparciu o energię wiązania substratu przez zmutowany enzym [31]. Skonstruowanie dodatkowych ortogonalnych par syntetaza-tRNA może pozwolić na równoczesne wprowadzenie kilku dowolnie zaprojektowanych aminokwasów do białka [32]. Metoda wykorzystująca supresję kodonu stop charakteryzuje się licznymi niedoskonałościami wynikającymi przede wszystkim z silnej konkurencji pomiędzy czynnikami uwalniającymi – RF a supresorowymi tRNA. Pewnym ograniczeniem jest również fakt, że do wprowadzenia nienaturalnych aminokwasów może być stosowany tylko kodon amber [3].

1.4. AMINOACYLACJA POD WYSOKIM CIŚNIENIEM

Dotychczasowe doświadczenia z wykorzystaniem wysokiego ciśnienia (ang. *high hydrostatic pressure*, HHP) w biotechnologii oraz w biochemii do badania struktury i funkcji cząsteczek biologicznych doprowadziły do zastosowania tej techniki do aminoacylacji tRNA nienaturalnymi aminokwasami. Pokazano, że pod ciśnieniem 6 kbar tRNA może być aminoacylowany dowolnym modyfikowanym aminokwasem w układzie pozbawionym AARS i donora energii w postaci ATP, a uzyskany produkt jest aktywny w syntezie *in vitro* na matrycy poli-U [33–37]. Przewaga tej metody nad wcześniej opisanymi wynika z faktu, że wykorzystuje się naturalne tRNA, pozbawione dodatkowych modyfikacji, oraz dowolne aminokwasy, bez konieczności stosowania grup blokujących. Dodatkowo, dzięki wykorzystaniu techniki wysokiego ciśnienia, otrzymanie aminoacylo-tRNA jest procesem o wiele prostszym, bo jednoetapowym. Najwyższą wydajność ciśnieniowej aminoacylacji otrzymano dla aminokwasów z grupą aromatyczną w łańcuchu bocznym 10–20%, natomiast dla alifatycznych 5–10%. Wynika to prawdopodobnie z możliwości oddziaływania tej grupy z pierścieniami zasad [34]. Reakcja ta polega na bezpośredniej estryfikacji grupy 2(3')OH rybozy za pomocą aminokwasu [35]. Ustalono także, że estryfikacji w tych warunkach ulega głównie 3' koniec tRNA.

PODSUMOWANIE

Do tej pory wprowadzono do sekwencji różnego rodzaju białek ponad 100 nienaturalnych aminokwasów [38]. Synteza białka *de novo* metodą chemiczną jest procesem czasochłonnym, a długość polipeptydów, które można otrzymać, jest ograniczona do ok. 100 aminokwasów. Mimo to, translacja *in vitro* przy użyciu rybosomów nadal pozostaje techniką stosowaną w laboratorium [38]. Kluczowym jej etapem jest jednak otrzymanie aktywnego aminoacylo-tRNA. Opracowanie zatem wysoko wydajnej i prostej metody aminoacylacji tRNA nienaturalnymi aminokwasami znacząco usprawni badania nad syntezą nowych, modyfikowanych białek, mających coraz szersze zastosowanie w biotechnologii. Dotychczasowe metody syntezy alloprotein (białek posiadających w swojej strukturze nienaturalne aminokwasy) – ze względu na swój skomplikowany przebieg, wymagający wieloetapowych i mało wydajnych syntez chemicznych – były czynnikami ograniczającymi rozwój badań. W porównaniu do wieloetapowej syntezy chemicznej oraz metod wymagających projektowania zmutowanych enzymów lub cząsteczek RNA o aktywności katalitycznej, technika wysokociśnieniowej aminoacylacji jawi się jako sposób najmniej skomplikowany i czasochłonny, a tym samym atrakcyjny do wykorzystania w laboratorium. Jednakże zastosowanie ortogonalnych par syntetaza-tRNA stwarza potencjalnie możliwość użycia tej technologii na większą skalę, a więc otrzymania znaczących ilości białka i poprawienia opłacalności tej metody.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] F.H.C. Crick, L. Barnett, S. Brenner, R.J. Watts-Tobin, Nature, 1961, **192**, 1227.
[2] A.J. Link, M.L. Mock, D.A. Tirrell, Curr. Opin. Biotech., 2003, **14**, 603.
[3] T. Hohsaka, M. Sisido, Curr. Opin. Chem. Biol., 2002, **6**, 809.
[4] D.A. Dougherty, Curr. Opin. Chem. Biol., 2000, **4**, 645.
[5] T.L. Hendrickson, V. Crecy-Legard, P. Schimmel, Annu. Rev. Biochem., 2004, 73, 147.
[6] Y. Kiso, H. Matsumoto, S. Mizumoto, T. Kimura, Y. Fujiwara, K. Akaji, Biopolymers, 1999, **51**, 59.
[7] D.B. Cowie, G.N. Cohen, Biochim. Biophys. Acta., 1957, **26**, 252.
[8] D.R.W. Hodgson, J.M. Sanderson, Chem. Soc. Rev., 2004, **33**, 422.
[9] K. Kruger, P.J. Grabowski, A.J. Zaug, D.E. Gottschling, T.R. Cech, Cell, 1982, **31**, 147
[10] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, Cell, 1983, **35**, 849.
[11] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P.B. Moore, T.A. Steitz, Science, 2000, **11**, 905.
[12] P.A. Loshe, J.W. Szostak, Nature, 1996, **381**, 442.
[13] H. Saito, H. Suga, J. Am. Chem. Soc., 2001, **123**, 7178.
[14] N. Lee, Y. Bessho, K. Wei, J.W. Szostak, H. Suga, Nature, 2000, **7**, 28.
[15] Y. Bessho, D.R.W. Hodgson, H. Suga, Nat. Biotechnol., 2002, **20**, 723.
[16] D.N. Frank, N.R. Pace. Annu Rev Biochem., 1998, **67**, 153.
[17] H. Saito, D. Kourouklis, H. Suga, EMBO J., 2001, **20**, 1797.
[18] H. Murakami, N.J. Bonzagni, H. Suga, J. Am. Chem. Soc., 2002, **124**, 6834.
[19] T.G. Heckler, L. Chang, Y. Zama, T. Naka, S.M. Hecht, Biochemistry, 1984, **23**, 1468.

[20] S.M. Hecht, B.L. Alford, Y. Kuroda, S. Kitano, J. Biol. Chem., 1978, **253**, 4517.
[21] Ch.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, Science, 1989, **244**, 182.
[22] T.G. Heckler, Y. Zama, T. Naka, S.M. Hecht, J. Biol. Chem., 1982, **258**, 4492.
[23] G. Baldini, B. Martgolio, J. Brunner, Biochemistry, 1988, **27**, 97951.
[24] S.A. Robertson, Ch. J. Noren, S. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, Nucleic Acids Res., 1989, **17**, 9649.
[25] K Ninomiya, T Kurita, T Hohsaka, M Sisido, Chem. Comm., 2003, **52**, 2242.
[26] N. Hashimoto, K. Ninomiya, T. Endo, M. Sisido, Chem. Commun., 2005, **43**, 4321.
[27] K. Ninomiya, T. Minohata, M. Nishimura, M. Sisido, J. Am. Chem. Soc., 2004, **126**, 15984.
[28] D.R. Corey, LIPS, 2003, **10**, 347.
[29] D. Kiga. K. Sakamoto, K. Kodama, T. Kigawa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, **99**, 9715.
[30] D. R Liu, T.J. Magliery, M. Pastrnak, P.G. Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, **94**, 10092.
[31] D. Zhang, V. Nagarajan, W.A. Goddard, J.F. Danzer, D. Debe, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, **99**, 6579.
[32] L. Wang, P.G. Schultz, Chem. Biol., 2001, **8**, 883.
[33] A. Krzyżaniak, J. Barciszewski, Int. Biol. Macromol., 1994, **16**, 153.
[34] M. Giel-Pietraszuk, J. Barciszewski, FEBS J., 2006, **273**, 3014.
[35] A. Krzyżaniak, J. Jurczak, S. Porowski, J. Barciszewski, Rev. High Pressure Sci. Technol., 1998, **7**, 1303.
[36] A. Krzyżaniak, J. Jurczak, Z. Maćkiewicz, G. Kupryszewski, S. Porowski, J. Barciszewski, High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, Ed. K. Heremans, Leuven, University Press, 1997, 527.
[37] S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, C.J. Noren, D.J. Suich, P.G. Schultz, Trends Biochem. Sci., 1989, **13**, 400.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 grudnia 2006

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 1-2
PL ISSN 0043-5104

BUDOWA I SYNTEZA GLIKOPEPTYDÓW

STRUCTURE AND SYNTHESIS GLYCOPEPTIDES

Justyna Samaszko, Agnieszka Łakomiec, Janusz Madaj

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego
ul. J. Sobieskiego 18, 80-952
email: samaszk@chem.univ.gda.pl

Abstract
Wykaz stosowanych skrótów
Wprowadzenie
1. Podział glikoprotein
   1.1. *N*-glikoproteiny
   1.2. *O*-glikoproteiny
2. Synteza
   2.1. Biosynteza
   2.2. Synteza enzymatyczna
   2.3. Synteza chemiczna
      2.3.1. Metoda ligacji z glikopeptydem
         2.3.1.1. Synteza *N*-glikoprotein
         2.3.1.2. Synteza *O*-glikoprotein
         2.3.1.3. Metoda natywnego łączenia
      2.3.2. Metoda remodelowania glikoprotein
      2.3.3. Metoda *in vivo* supresyjna tRNA
3. Nietypowe glikoproteiny
   3.1. *C*-glikoproteiny
   3.2. *S*-glikoproteiny
   3.3. *P*-glikoproteiny
Piśmiennictwo cytowane

Mgr Justyna Samaszko urodziła się w 1980 r. w Gdańsku. W 2004 r. ukończyła studia – kierunek chemia, specjalizacja chemia biologiczna na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W tym też roku rozpoczęła tam studia doktoranckie. Obecnie przygotowuje pracę doktorską na temat chemicznej syntezy fragmentu peptydoglikanu ściany komórkowej gronkowca złocistego (*S. aureus*).

Mgr Agnieszka Łakomiec urodziła się w 1980 r. w Skarżysku-Kamiennej. W roku 2005 ukończyła studia – kierunek chemia – na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W tym samym roku zaczęła na tej uczelni studia doktoranckie. Pracę doktorską przygotowuje na temat modyfikacji wankomycyny jednostkami sacharydowymi.

Dr hab. Janusz Madaj urodził się w 1965 r. w Pucku. W roku 1989 ukończył studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Od tego roku jest związany zawodowo z tą uczelnią. Pracę doktorską, wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Wiśniewskiego, pt. „O reakcjach przegrupowania per--*O*-acetylowych pochodnych 1,5-anhydro-2-deoksy-1-enitoli", obronił w 1995 r. W roku 1998 odbył roczny staż naukowy w Case Western Reserve University, Cleveland (USA). W roku 2005 uzyskał stopień doktora habilitowanego. Obecnie jest adiunktem na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego i pracuje naukowo w Zakładzie Chemii Cukrów. Jest współautorem ponad trzydziestu prac z dziedziny chemii cukrów.

ABSTRACT

During the past decades it has been recognized that most of the natural proteins of mammals carry covalently linked saccharide side chains. The carbohydrate portions of the glycoproteins as well as those of glycolipids obviously play key roles in biological recognition processes.

A glycoprotein is a compound containing carbohydrate (or glycan) covalently linked to protein. The carbohydrate may be in a form of monosaccharide, disaccharide(s), oligosaccharide(s), polysaccharide(s), or their derivatives (e.g. sulfo- or phospho-substituted). One, a few, or many carbohydrate units may be present.

There are two most common types of glycoproteins: *O*- and *N*-glycoproteins. In eukaryotes, the most prevalent type of *O*-linked glycosylation is the mucin-type glycosylation, where *N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) is linked in an α-anomeric configuration to the β-hydroxyl group of either a serine or a threonine residue of the polypeptide. Other types of *O*-linked glycosylation include glycosaminoglycans, such as heparin and chondrotin sulfate, which are attached to the polypeptide chain through β-linked xylose residues.

An older and more prevalent type of glycosylation, *N*-linked glycosylation, is found in a wide range of organisms ranging from Archae to mammals and other eukaryotes. *N*-Glycosylation is a modification performed cotranslationally (during the translation of mRNA to protein) and is available to any secreted or membrane--bound protein containing the triplet amino acid sequence AsnXxxSer/Thr (where Xxx is any amino acid except Pro). An oligosaccharide is transferred to the amide side chain of Asn from a dolichol phosphate glycosyl donor, by the action of membrane-bound oligosaccharyl transferase in the endoplasmic reticulum (ER). The fully translated glycoprotein is then subject to glycan trimming and processing which is further elaborated in the ER and Golgi apparatus.

Keywords: *N*- i *O*- glycoproteins

Słowa kluczowe: *N*- i *O*-glikoproteiny

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Używane w tekście symbole aminokwasów oraz ich pochodnych są zgodne z postanowieniami IUPAC-IUB Joint Commision on Biochemical Nomenclature zawartymi w Eur. J. Biochem., 1984, **138**, 9–37 oraz A Short Guide to Abbreviations and Their Use in Peptide Science, J. Peptide Sci., 1999, **5**, 465–471. W wypadkach nie objętych postanowieniami stosowano oznaczenia powszechnie przyjęte w chemii peptydów.

Używane w tekście symbole sacharydów oraz ich pochodnych są zgodne z postanowieniami IUPAC-IUB Joint Commision on Biochemical Nomenclature zawartymi w Eur. J. Biochem., 1989, **159**, 1–6; Glycoconjugate J., 1986, **3**, 123–134; J. Biol Chem., 1987, **262**, 13–18,

AA	– reszta aminokwasowa
Ac	– acetyl
Cbz	– grupa benzyloksykarbonylowa
EGF	– domena czynnika wzrostu
ER	– retikulum endoplazmatyczne
Fmoc	– grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
Gal	– D-galaktoza
GalNAc	– *N*-acetylo-D-galaktozamina
Glc	– D-glukoza
GlcNAc	– *N*-acetylo-D-glukozamina
LLO	– lipidowe pochodne podstawionych fragmentów oligosacharydowych (ang. *Lipid-Linked Oligosaccharides*)
Man	– D-mannoza
OT	– oligosacharydowa transferaza
OtBu	– grupa *O*-*tert*-butyloksykarbonylowa
SPPS	– synteza peptydów na nośniku stałym (ang. *Solid Peptide Phase Synthesis*)
TAG	– Amber stop kodon
Xyl	– D-ksyloza

WPROWADZENIE

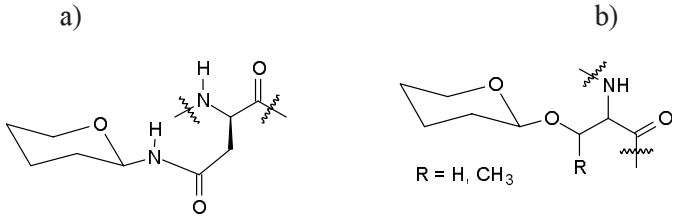
Węglowodany ze względu na budowę dzielimy na trzy podstawowe grupy związków: monosacharydy, disacharydy i polisacharydy. Dość często występują w połączeniach z innymi związkami chemicznymi, takimi jak lipidy lub białka, tworząc bardziej złożone struktury chemiczne np. glikokoniugaty. Szczególny rodzaj tego typu połączeń stanowią glikoproteiny. Zbudowane są one z fragmentu białkowego połączonego wiązaniem kowalencyjnym z cząsteczką cukru lub glikanu. Fragmentem cukrowym występującym w glikoproteinie może być monosacharyd, disacharyd albo liniowy lub rozgałęziony oligo- czy polisacharyd [1]. Wyróżniamy kilka typów takich połączeń, ale do najbardziej znanych zaliczamy *N*- i *O*-glikoproteiny. Wchodzą one m.in. w skład ścian komórkowych bakterii, występują w osoczu krwi (owoalbumina, kolagen) lub tkankach łącznych. Glikoproteiny w naturze powstają w wyniku reakcji glikozylacji, będącej najważniejszym i najczęściej spotykanym przykładem modyfikacji zarówno ko- i post-translacyjnych białek. Modyfikacje kotranslacyjne zachodzą najczęściej na *N*-końcu fragmentu peptydowego w trakcie trwania syntezy białka. Natomiast modyfikacje postranslacyjne polegają na specyficznym rozszczepieniu polipeptydów lub przyłączaniu fragmentów cukrowych do białka.

Przez wiele lat, ze względu na różnice w budowie, za odrębną klasę związków uważano proteoglikany. Dzisiaj przyjmuje się, że stanowią one pewnego rodzaju podklasę glikoprotein. Proteoglikany, w przeciwieństwie do glikoprotein, zbudowane są z długich łańcuchów polisacharydowych składających się z jednostek aminodeoksycukrowych (glikozaminoglikanów), zwanych również mukopolisacharydami. Glikozaminoglikany stanowią długie nierozgałęzione łańcuchy polisacharydowe zbudowane z powtarzających się fragmentów disacharydowych, zawierających kwasy uronowe i heksozaminy (występujące często w postaci pochodnych siarczanowych, jak np. w heparynie). Szczególnym przykładem proteoglikanów są peptydoglikany, zbudowane z długich łańcuchów polisacharydowych, składających się z powtarzających się jednostek *N*-acetylo-D-glukozaminy (GlcNAc) oraz kwasu *N*-acetylo-D-muraminowego (MurNAc), połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glikozydowym. W niektórych peptydoglikanach, zamiast reszty MurNAc, występuje kwas L-talozoaminouronowy. Do grupy karboksylowej kwasu *N*-acetylo-D-muraminowego przyłączony jest fragment peptydowy składający się z reszt L- i D- aminokwasów, a w przypadku kwasu L-talozaminouronowego fragment ten składa się wyłącznie z L-aminokwasów [1].

1. PODZIAŁ GLIKOPROTEIN

Wyróżniamy zasadniczo dwa typy połączeń kowalencyjnych pomiędzy cząsteczką cukru a fragmentem peptydowym, będące wynikiem modyfikacji zachodzących w obrębie łańcuchów bocznych reszt aminokwasów (Rys. 1) [2]. Są to odpo-

wiednio pochodne *N*-glikozydowe grupy aminowej reszty L-asparaginy (Asn) (Rys. 1a), rzadziej L-argininy (Arg), oraz *O*-glikozydowe grupy hydroksylowej reszty L-seryny (Ser) i L-treoniny (Thr) (Rys. 1b), L-tyrozyny (Tyr), L-hydroksylizyny (Hyl) czy L-hydroksyproliny (Hyp).



Rysunek 1

1.1. *N*-GLIKOPROTEINY

Wiązanie *β*-*N*-glikozydowe pomiędzy resztą *N*-acetylo-D-glukozaminy a resztą L-asparaginy stanowi jeden z najczęściej spotykanych typów połączenia cukier–peptyd. Wiązanie to powstaje w wyniku modyfikacji kotranslacyjnych reszty L-asparaginy zachodzących w retikulum endoplazmatycznym. Reakcja glikozylacji ma miejsce wówczas, gdy reszta L-asparaginy wchodzi w skład określonej sekwencji peptydowej Asn-Xxx-Ser/Thr, gdzie Xxx oznacza dowolną resztę aminokwasową z wyłączeniem L-proliny. Przez długie lata uważano, że jedynym fragmentem cukrowym, który wiąże się z łańcuchem bocznym L-asparaginy jest *N*-acetylo-D-glukozamina [3].

Wyróżniamy trzy podstawowe typu *N*-glikanów:

1. wysokomannozowy (ang. *oligomannose type*) (Rys. 2a);
2. hybrydowy (ang. *hybride type*) (Rys. 2b);
3. kompleksowy (ang. *complex type*) (Rys. 2c).

a)
```
Manα1-2-Manα1-6
                Manα1-6
Manα1-2-Manα1-3         Manβ1-4-GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn
Manα1-2-Manα1-2-Manα1-3
```

b)
```
                Manα1-6
                        Manα1-6
                Manα1-3         Manβ1-4-GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn
NeuAcα2-6-Galβ1-4-GlcNAcβ1-2-Manα1-3
```

c)
```
NeuAcα2-6-Galβ1-4-GlcNAcβ1-2-Manα1-6
                                    Manβ1-4-GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn
NeuAcα2-6-Galβ1-4-GlcNAcβ1-2-Manα1-3
```

Rysunek 2

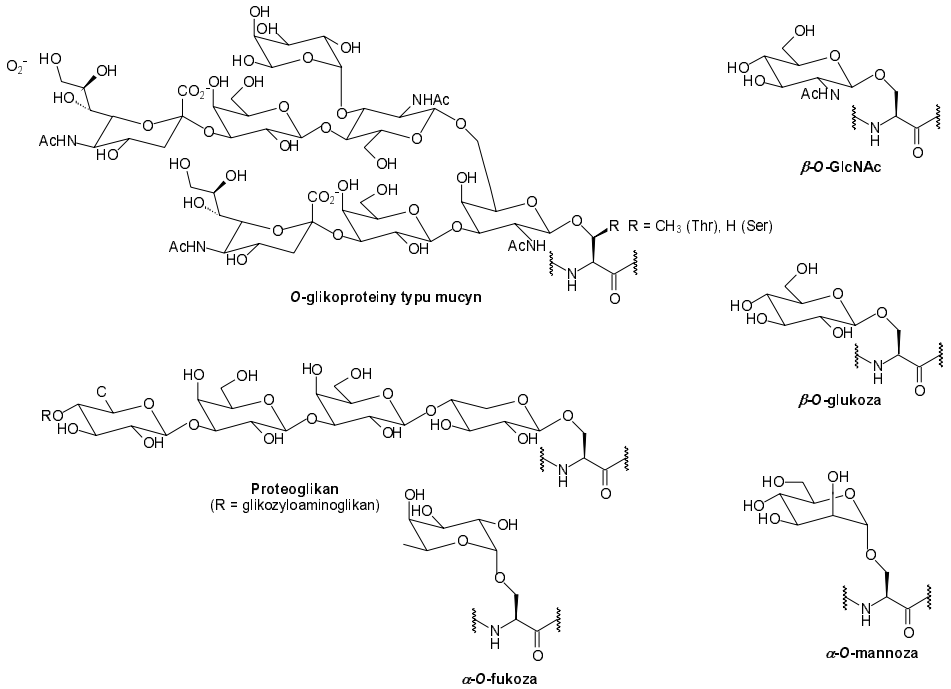
1.2. *O*-GLIKOPROTEINY

Wiązanie występujące pomiędzy fragmentem cukrowym a grupą hydroksylową reszty aminokwasowej Ser, Thr, Hyl, Hyp, Tyr jest przykładem połączeń typu *O*-glikozydowego. Ze względu na szeroką gamę reszt aminokwasów mogących tworzyć *O*-glikozydy, są one powszechne i stanowią podstawę budowy wielu zmodyfikowanych peptydów. Możliwość tworzenia wiązań o różnej konfiguracji anomerycznego atomu węgla (α lub β), a także różnorodność występujących fragmentów cukrowych sprawia, że wyróżniamy sześć charakterystycznych struktur tej grupy związków. Do najczęściej występujących zaliczana jest GalNAc-α-Ser/Thr, występująca między innymi w mucynie, skąd wzięła się również nazwa: *O*-glikoproteiny typu mucyn (Rys. 3) [4]. Ze względu na różnorodność przyłączonych fragmentów cukrowych (zbudowanych z około 1–20 reszt cukrowych), łańcuchy *O*-glikozydowe mucyn dzieli się na trzy zasadnicze części: 1. odcinek rdzeniowy (ang. *inner core*), 2. odcinek szkieletowy (ang. *backborne*), 3. obwodowy (ang. *periphery*) [5]. Odcinek rdzeniowy, stanowiący wewnętrzny fragment mucyny, zbudowany jest z fragmentu polipeptydowego, którego reszty L-seryny/L-treoniny połączone są z redukcyjnym końcem D-galaktozy (Gal) lub *N*-acetylo-D-galaktozaminy. Do tej pory odkryto około 8 typów tego typu rdzeni (Tabela 1) [5, 6].

Tabela 1. Osiem typów rdzeniowych łańcuchów *O*-glikozdowych mucyny

Region rdzeniowy (R)	
Typ 1	Galβ1-3GalNAc-R
Typ 2	GlcNAcβ1-6[Galβ1-3]GalNAc-R
Typ 3	GlcNAcβ1-3GalNAc-R
Typ 4	[GlcNAcβ1-6]GlcNAcβ1-3GalNAc-R
Typ 5	GalNAcα1-3GalNAc-R
Typ 6	GlcNAcβ1-6GalNAc-R
Typ 7	GalNAcα1-6GalNAc-R
Typ 8	GalNAcα1-3GalNAc-R

Innym przykładem połączeń *O*-glikozydowych są proteoglikany zbudowane z glikozaminoglikanów (np. heparyna) i fragmentu polipeptydowego przyłączonego bezpośrednio do reszty β-D-ksylozy (Xyl). Kolejnymi przykładami są β-*O*-podstawiona D-glukoza (Glc), α-*O*-podstawiona D-mannoza (Man) czy α-*O*-podstawiona D-fukoza (Fuc) (Rys. 3).



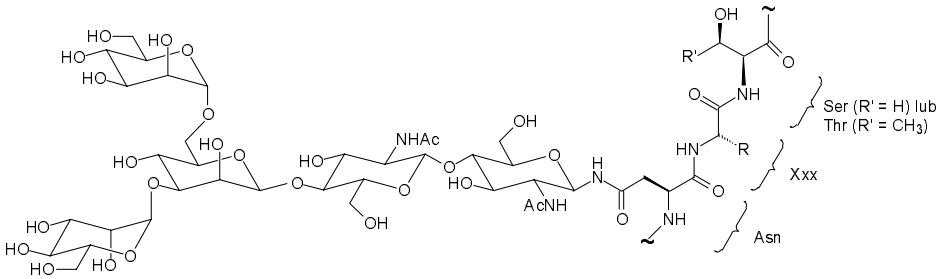
Rysunek 3

2. SYNTEZA

2.1. BIOSYNTEZA

Biosynteza glikoprotein jest procesem złożonym, przebiegającym w kilku zasadniczych etapach. W przypadku *N*-glikoprotein zachodzi ona w głównej mierze w retikulum endoplazmatycznym, natomiast synteza *O*-glikoprotein ma miejsce w aparacie *Golgi*. Proces biosyntezy zasadniczo opiera się na reakcji glikozylacji, stanowiącej przykład modyfikacji post- i kotranslacyjnych protein. Przyłączenie fragmentu oligosacharydowego do peptydu w początkowym etapie syntezy glikoprotein wiąże się z kluczową rolą węglowodanów w kontrolowaniu nowopowstających protein. Powstające wiązanie kowalencyjne pomiędzy fragmentem cukrowym a peptydowym zmienia charakter oddziaływań wewnątrzkomórkowych typu peptyd–peptyd, proteina–cukier. Ułatwia też proces fałdowania białek, a także tworzenia się wyższych struktur białkowych [7]. Biosynteza *N*-glikoprotein jest przykładem modyfikacji kotranslacyjnych zachodzących w obrębie komórki. Rozpoczyna się ona od syntezy LLO (ang. *lipid-linked oligosaccharides*), lipidowych pochodnych podstawionych fragmentami oligosacharydów, będących prekursorami fragmentu dolichol-

-$GlcNAc_2Man_9Glc_3$ (Rys. 4) [7]. W trakcie biosyntezy oligosacharydowa transferaza (OT) odpowiedzialna jest za przeniesienie czteroantenowego (ang. *tetraantenary*) tetrasacharydu $GlcNAc_2Man_9Glc_3$ w kierunku amidowego atomu azotu z łańcucha bocznego reszty L-asparaginy. Reakcja glikozylacji zachodzi wówczas, gdy reszta L-asparaginy wchodzi w skład pierwszorzędowej struktury o określonej sekwencji peptydowej Asn-Xxx-Ser/Thr, gdzie Xxx oznacza dowolną resztę aminokwasową z wyłączeniem L-proliny. Za bezpośrednie przyłączenie fragmentu cukrowego do peptydu odpowiedzialna jest szeroka gama glikotransferaz oraz glikohydrolaz, których efektem działania jest pentasacharydowy rdzeń (Rys. 4) [7].



Rysunek 4

Glikozylacja prowadząca do powstania *O*-podstawionych pochodnych glikoprotein opiera się na kilkuetapowej addycji monosacharydów bezpośrednio do grup hydroksylowych z łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego. Pierwszą resztą cukrową przyłączoną do *O*-glikanu jest najczęściej *N*-acetylo-D-galaktozamina, która podstawiana jest do łańcucha bocznego reszty L-seryny lub L-treoniny [7]. Wyjątek stanowi biosynteza kolagenu, w którym pierwszą resztą cukrową jest D-galaktoza lub disacharyd D-glikozylo-D-galaktoza, wiążący się z 4-L-hydroksylizyną. Kluczowym etapem biosyntezy *O*-glikoprotein jest tworzenie się antygenu Tn (*N*-acetylo-D-galaktoaminylo-(α1-*O*)-L-seryna/treonina). Tego typu połączenia są szeroko rozpowszechnione w mucynie. Następnie do antygenu Tn, w wyniku działania glikotransferaz, przyłączane są kolejne reszty cukrowe (Gal, GalNAc lub GlcNAc), prowadząc do powstania około ośmiu specyficznych struktur. Stanowią one podstawę do powstania bardziej rozbudowanych glikoprotein. Zdarza się również, że reszty kwasu sialowego przyłączane są do terminalnego rdzenia struktury antygenu Tn, tworząc bardziej zróżnicowane formy glikoproteiny. Dalszy etap biosyntezy polega na wydłużaniu łańcucha oligosacharydowego [7].

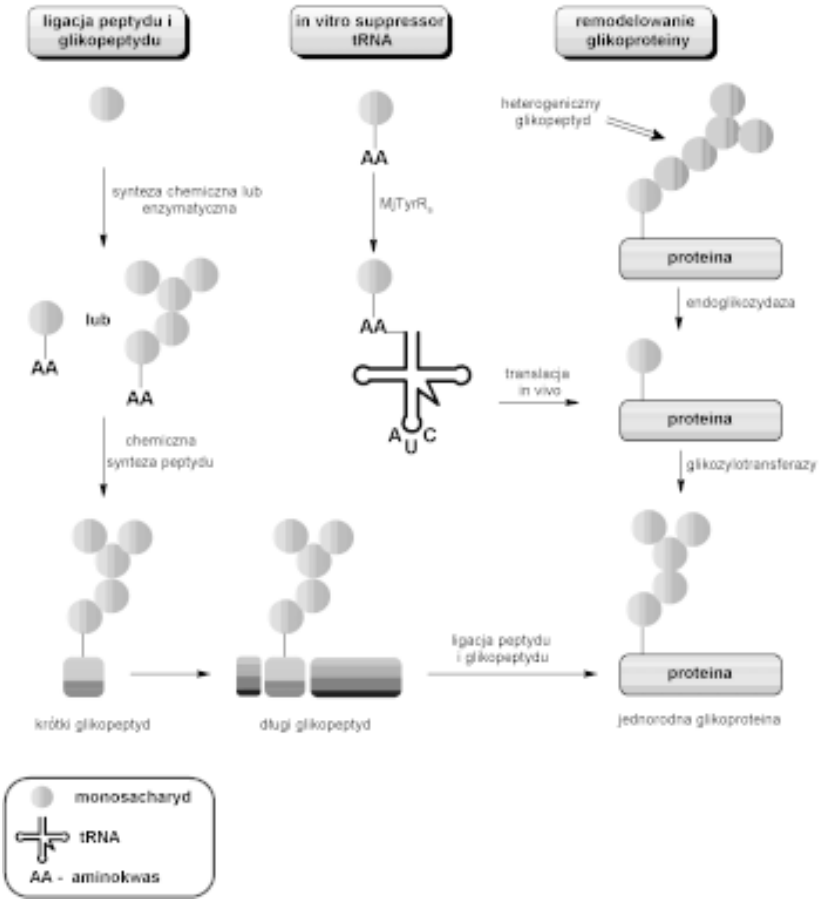
2.2. SYNTEZA ENZYMATYCZNA

Z roku na rok wzrasta zainteresowanie alternatywnymi technikami syntezy glikoprotein w stosunku do syntezy chemicznej. Przykładem takiej metody jest synteza enzymatyczna. Oprócz otrzymywania związków ze stosunkowo wysoką wydajnością i czystością, istotną zaletą przeprowadzanych tego typu syntez jest ich regio-, jak i stereoselektywność. Istnieją dwie zasadnicze klasy enzymów, stosowanych w trakcie przeprowadzanych syntez: glikozylotransferazy (np. β-1,4-glikozylotransferaza, wyodrębniona z siary wołowej bierze udział w rozpoznawaniu terminalnej reszty *N*-acetylo-D-glukozaminy jako akceptora glikozylu, a dodatkowo katalizuje selektywne formowanie się oligosacharydu (Galβ1→4GlcNAc)) oraz glikozydazy (odpowiedzialne są za hydrolizę wiązania glikozydowego w warunkach *in vivo*) [8, 9].

2.3. SYNTEZA CHEMICZNA

W celu dokładniejszego poznania struktury i funkcji glikoprotein rozpoczęto pracę nad udoskonaleniem metod ich syntezy. Izolowanie z materiału biologicznego wymagało niejednokrotnie użycia wielu kosztownych technik oczyszczania, nie zawsze jak się okazało wystarczająco skutecznych. Obecnie uważa się, że jedynie synteza chemiczna czy enzymatyczna są właściwymi drogami otrzymania określonych fragmentów glikoprotein. Stosując te techniki można uzyskać wysokiej czystości dobrze zdefiniowany materiał do badań biologicznych. Metody te dają dodatkowo możliwość wprowadzenia nie występujących naturalnie reszt aminokwasów czy też fragmentów cukrów. Glikoproteiny otrzymuje się przede wszystkim na drodze (Schemat 1) [10]:

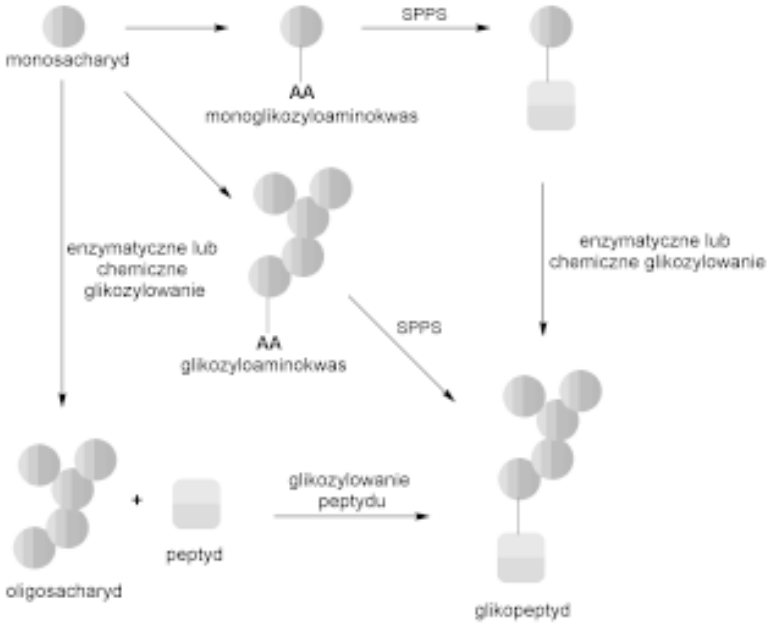
1) łączenia (ligacji) peptydu z glikopeptydem;
2) remodelowania glikoproteiny;
3) *in vivo* supresyjnej tRNA.



Schemat 1

2.3.1. Metoda ligacji peptydu z glikopeptydem

Podstawowe założenia metody glikoproteinowej ligacji opierają się na syntezie krótkiego fragmentu glikoproteinowego, a następnie połączeniu go z dłuższym polipeptydem, wykorzystując technikę enzymatyczną lub chemoselektywną. Zaletą tej metody jest możliwość wprowadzenia zarówno naturalnych, jak i nie występujących w przyrodzie fragmentów glikanów lub reszt aminokwasów [10]. Krótkie fragmenty glikopeptydów otrzymuje się na trzy sposoby (Schemat 2).



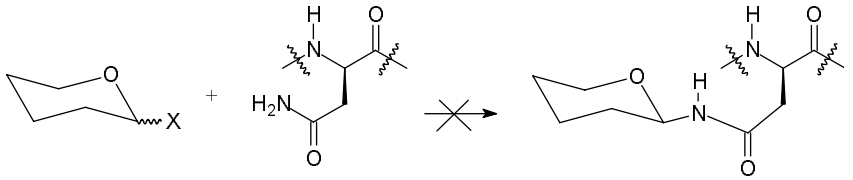
Schemat 2

Jednym ze sposobów jest stopniowa synteza glikoprotein, opierająca się na syntezie fragmentów cukrowych i peptydowych oddzielnie, i w końcowym etapie – ich wzajemnym połączeniu. Drugi sposób wykorzystuje glikozylowane pochodne reszt aminokwasów stosowanych następnie w syntezie etapowej SPPS (ang. *solid phase peptide synthesis*). Trzeci sposób opiera się na syntezie pochodnych oligosacharydów zawierających reszty aminokwasów i wbudowywaniu ich w długie łańcuchy peptydowe przy wykorzystaniu technik syntezy chemicznej i enzymatycznej.

Chemiczna synteza glikoprotein napotyka na kilka problemów. Spowodowane jest to znaczną labilnością wiązań występujących w *N*-, jak i *O*-glikoproteinach.

2.3.1.1. Synteza *N*-glikoprotein

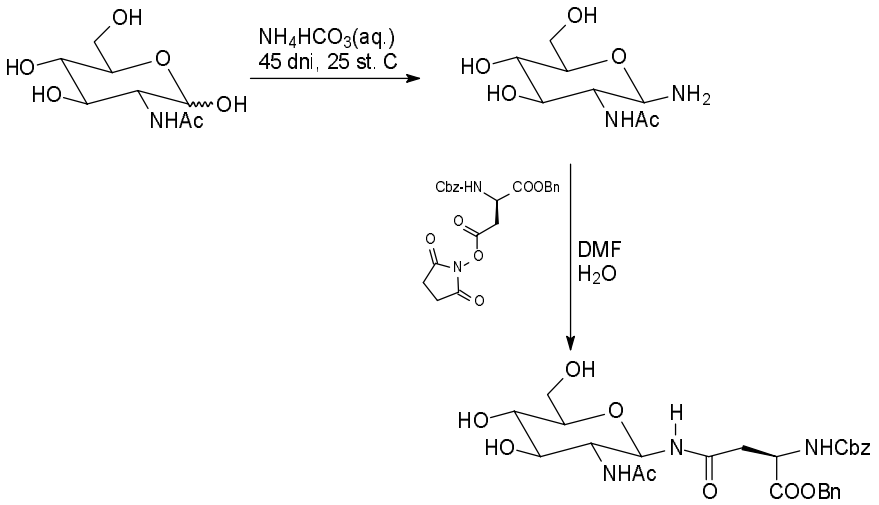
W przypadku syntezy *N*-glikoprotein bezpośrednia reakcja glikozylowania grupy amidowej łańcucha bocznego reszty L-asparaginy nie została jeszcze opisana (Schemat 3) [11].



Schemat 3

Istnieje kilka metod otrzymywania *N*-podstawionych pochodnych glikoprotein. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się reakcję pochodnej glikozyloaminy z odpowiednio chronionymi pochodnymi Asp. Pochodne glikozyloaminy otrzymuje się m.in. na drodze przekształcenia bromków glikopiranozylu w odpowiednie azydki, które poddane redukcji, prowadzą do otrzymania odpowiednich amin [12].

Pochodną glikozyloaminy można również otrzymać w wyniku reakcji niechronionego fragmentu cukru z wodorowęglanem amonu lub amoniakiem (Schemat 4), a następnie poddaniu jej reakcji sprzęgania z pochodną aminokwasu. Przykładową reakcję tworzenia wiązania pomiędzy resztą GlcNAc *a pochodną* Asp zaproponował Likhoshertov [13].

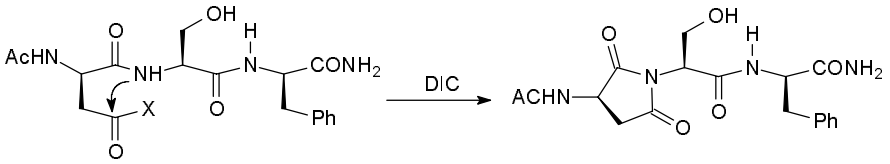


Schemat 4

W celu aktywacji grupy karboksylowej stosuje się typowe środki znane w chemii peptydów, np.: DCC (*N*,*N*-dicykloheksyloakarbodiimid), HOBt (*N*-hydroksybenzotriazol), HATU (heksafluorofosforan *O*-(7-azabenzotriazol-1-ilo)-*N*,*N*,*N*',*N*'--tetrametylouroniowy), TBTU (tetrafiuoroboran 2-(1-benzotriazolilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy).

Istotnym problemem w tworzeniu *N*-glikozydów w reakcji z fragmentem peptydowym jest powstawanie w trakcie reakcji pochodnej aspartimidowej (Sche-

mat 5). Stanowi ona przykład reakcji ubocznej, zachodzącej wewnątrz łańcucha peptydowego, prowadzącej do powstania wewnątrzcząsteczkowego sukcynimidu [11].

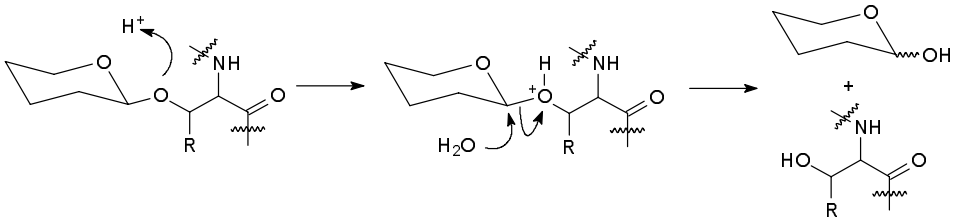


Schemat 5

2.3.1.2. Synteza *O*-glikoprotein

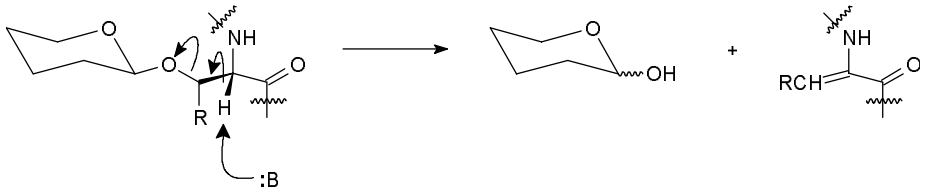
Otrzymywanie *O*-połączonych glikozydów aminokwasów utrudnione jest przez dwa czynniki [14, 15]:

1) Wrażliwość wiązania glikozydowego na obecność kwasów (Schemat 6).



Schemat 6

2) Reakcję *retro*-Michaela, której promotorem są zasady. Ulegają jej reszty L-seryny i L-treoniny. Reakcja ta opiera się na uwolnieniu *O*-podstawionych węglowodanów w glikoproteinie (Schemat 7).



Schemat 7

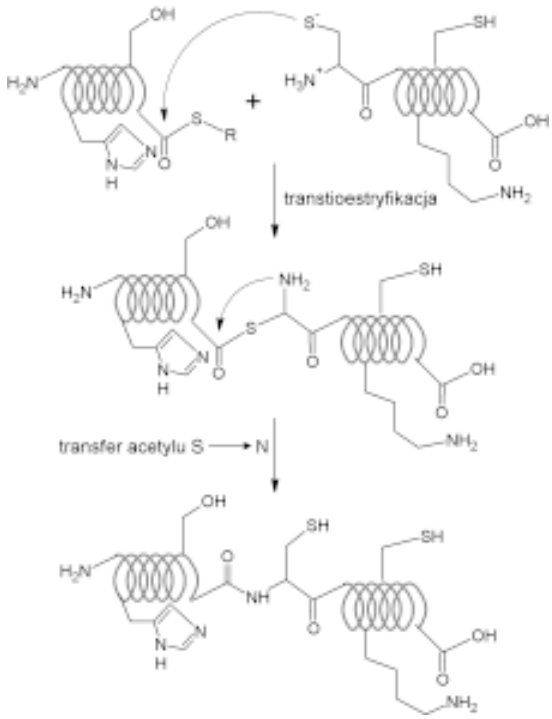
Synteza *O*-glikoprotein wymaga zastosowania odpowiednio chronionych substratów i obojętnego środowiska reakcji.

Reakcja glikozylowania I i II-rzędowych grup hydroksylowych łańcuchów bocznych reszt aminokwasów nie różni się w sposób zasadniczy od reakcji tworzenia wiązania glikozydowego pomiędzy dwiema jednostkami cukru. Przyczyniło się to do szerokiego wykorzystywania metod sprzęgania stosowanych w chemii cukrów.

Otrzymane glikozylowane pochodne aminokwasów (fragmenty mono- i oligosacharydów) mogą być wykorzystywane zarówno w syntezie w roztworze, jak i na nośniku stałym. Niestety, niejednokrotnie reakcje te odznaczają się niską wydajnością. Standardowe metody syntezy pozwalają na otrzymywanie z dobrymi wydajnościami glikoprotein zbudowanych z około 10–50 reszt aminokwasów. W przypadku otrzymywania dłuższych fragmentów glikoprotein, przy zastosowaniu techniki syntezy na nośniku stałym, ma miejsce wzrost stężenia produktów ubocznych, wpływając na niską wydajność i czystość otrzymywanego związku [10].

2.3.1.3. Metoda natywnego łączenia

Glikoproteiny zbudowane z powyżej 50 reszt aminokwasowych otrzymuje się obecnie na drodze natywnego (występującego naturalnie) łączenia. Metoda ułatwia w prosty sposób izolowanie i oczyszczanie produktów kondensacji glikoprotein.



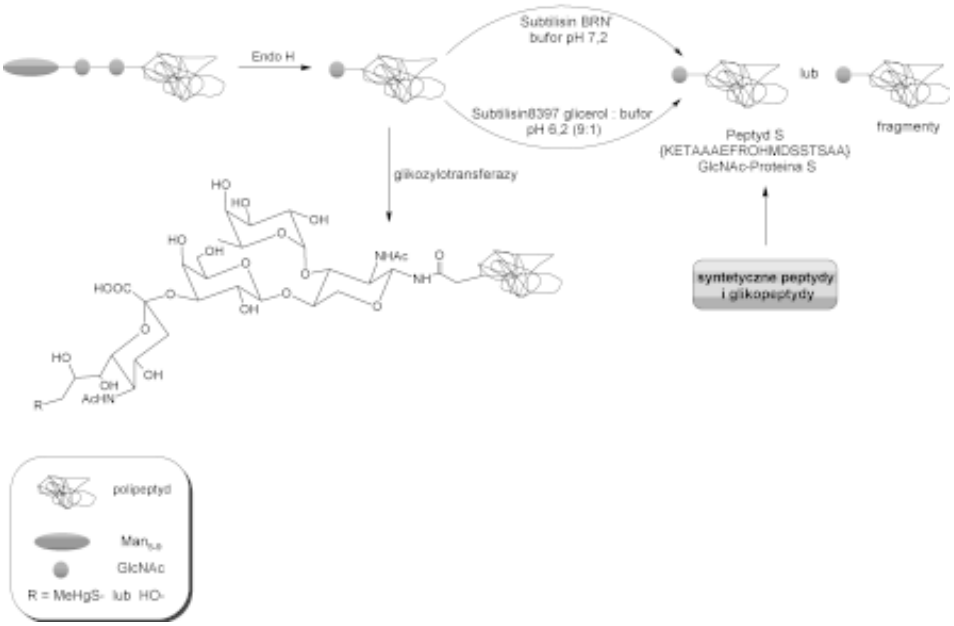
Schemat 8

C-Terminalny koniec glikoproteiny, będący akceptorem nowo powstającego wiązania, ze względu na obecność innych reaktywnych grup z łańcucha bocznego peptydu, wymaga selektywnej aktywacji. W tym celu wykorzystuje się w niej pochodne tioestrowe. W momencie zmieszania niechronionej pochodnej tioestrowej peptydu z drugą pochodną, zawierającą na *N*-końcu resztę L-cysteiny, ma miejsce reakcja transestryfikacji. W pochodnej tioestrowej zachodzi wówczas spontaniczna, niekontrolowana zamiana atomu siarki na atom azotu (S→N), prowadząc do powstania natywnej formy wiązania amidowego (Schemat 8) [16].

2.3.2. Metoda remodelowania glikoprotein

Alternatywna metoda syntezy *N*-podstawionych glikanów opiera się na wykorzystaniu enzymatycznych metod przekształcania niejednorodnych pochodnych proteiny w pojedynczą jednorodną glikoproteinę. W zasadniczym etapie hydroendoglikolaza hydrolizuje wiązanie pomiędzy dwiema resztami GlcNAc w bis-*N*-acetylochitobiozie umożliwiając równocześnie przyłączenie GlcNAc do reszty Asn [17].

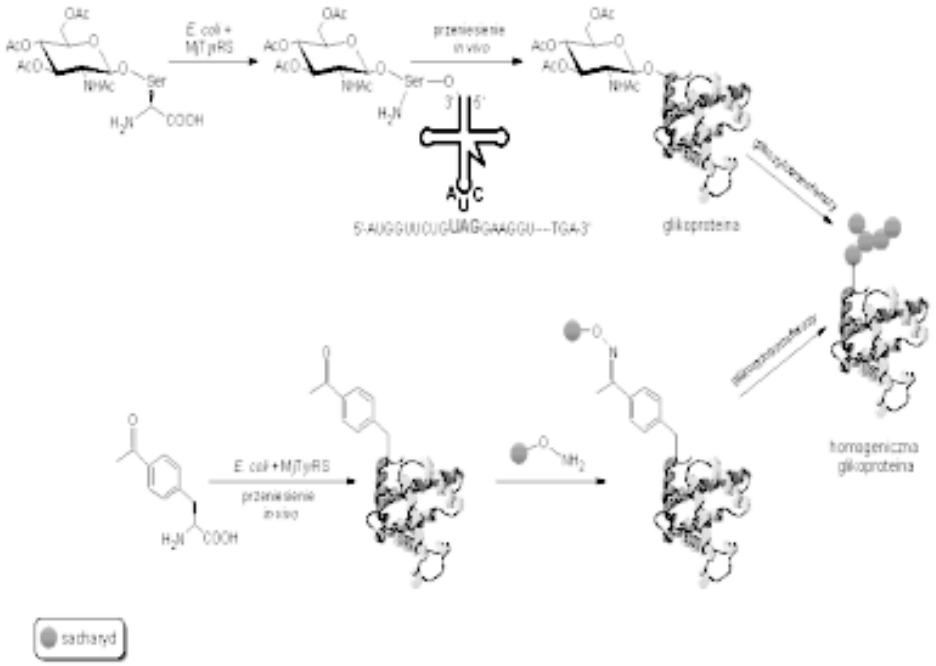
Innymi stosowanymi enzymami są endoglikozydazy (Schemat 9). Rozpoznają one różne fragmenty łańcucha glikanów. W dalszym kroku glikozylotransferaza w obecności cukrowych nukleotydów bierze udział w budowaniu właściwego kompleksu glikoproteinowego. Metoda ta, niestety, jest kosztowna, co stanowi barierę w zastosowaniu jej na większą skalę [18].



Schemat 9

4.3.3. Metoda *in vivo* supresyjna tRNA

W ostatnim czasie metoda supresyjna tRNA wykorzystana została do otrzymywania rekombinowanych *neo*- i *gliko*protein. Polega ona na wbudowywaniu w trakcie biosyntezy protein naturalnie nie występujących reszt aminokwasowych, przy wykorzystaniu zmodyfikowanego kodonu tRNA. Ortogonalna syntetaza tRNA i pary tRNA mogą zostać połączone ze zmodyfikowanymi resztami aminokwasów, np. *N*-acetylo-D-glukozamino-β-L-seryną lub *p*-acetylofenyloalaniną, a następnie przekształcone w kodon TAG w trakcie biosyntezy protein w warunkach *in vivo*. W dalszym etapie syntezy, w wyniku działania glikotransferaz, mogą być dołączone kolejne reszty cukrowe, prowadząc do powstania jednorodnej glikoproteiny (Schemat 10) [10].



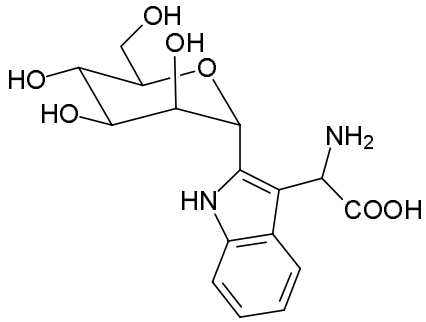
Schemat 10

3. NIETYPOWE GLIKOPROTEINY

3.1. *C*-GLIKOPROTEINY

Wiązanie pomiędzy atomem C-2 łańcucha bocznego L-tryptofanu a resztą D-mannozy jest przykładem połączenia α-*C*-glikozydowego. Obecność tego typu

wiązania odkryta została w proteinach ssaków, np. Rnase2, interleukinie-12 czy properdynie (Rys. 5) [19, 20].

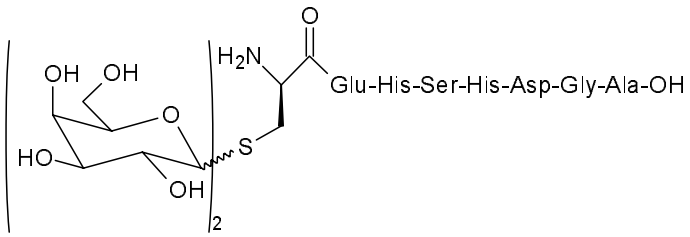


Rysunek 5

Vetesy i jego współpracownikom udało się wyizolować rodzinę związków noszących nazwę enkastyn (ang. *enkastines*) z *Streptomyces albus*, ATCC 21 838. Stanowią one potencjalne inhibitory enkefaliny. Tego typu *C*-glikozydy można otrzymać na drodze reakcji Amadori pomiędzy resztą D-glukozy, a odpowiednim dipeptydem [19, 20].

3.2. *S*-GLIKOPROTEINY

W 1971 r. po raz pierwszy udało się wyodrębnić pierwszy *S*-glikozylowany peptyd. Lote i Weiss wyizolowali oktapeptyd (Rys. 6) z ludzkiego moczu [21, 22].



Rysunek 6

Jednostki digalaktozy połączone są z łańcuchem bocznym *N*-terminalnej L-cysteiny wiązaniem *S*-glikozydowym.

Otrzymywanie *S*-glikozydowych połączeń z aminokwasami prowadzi się w celu zapewnienia chemicznej stabilizacji i odporności na hydrolizę enzymatyczną określonej gamy protein. Istnieje kilka metod syntezy opisanych w literaturze. Najważniejsze z nich to reakcja Kenigsa-Knorra fluorków glikopiranozylu i reakcja gliko-

zylowania katalizowana kwasami Lewisa. W syntezie wykorzystywane były chronione fragmenty cukru i odpowiednio zabezpieczone pochodne L-cysteiny [12].

3.3. *P*-GLIKOPROTEINY

Jednym z rzadziej występujących typów połączeń są *P*-glikoproteiny. Fosforamidon jest glikozylowanym dipeptydem, którego *N*-terminalny koniec Leu-Trp połączony jest z resztą L-Rha poprzez wiązanie fosfoamidowe. Stanowi on potencjalny inhibitor metaloproteinaz [23]. Innym przykładem związków, w których występuje wiązanie fosfoamidowe pomiędzy resztą GlcNAc, a łańcuchem bocznym Ser, są m.in. proteinaza 1, lizosomalna proteinaza cysteinowa. Związki te wyodrębnione zostały z *Dictyostelium discoideum* [23, 24].

PODZIĘKOWANIE

Badania dofinansowane były przez Europejski Fundusz Społeczny (EFS) (projekt nr ZPORR/2.22/II/2.6/ARP/U/2/05 „Stypendia dla doktorantów Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego na prowadzenie badań naukowych"), a także BW/ 8000-5-0042-6.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] a) N. Sharon, Eur. J. Biochem., 1986, **159**, 1 b) N. Sharon, Eur. J. Biochem., 1989, **185**, 485; c) N. Sharon, Glycoconjugate J., 19986, **3**, 123; d) N. Sharon, J. Biol. Chem., 1987, **262**, 13; e) N. Sharon, Pure Appl. Chem., 1988, **60**, 1389; f) N. Sharon, Amino Acids and Peptides, 1990, **21**, 329.
[2] T.D. Butters, *Encyclopedia of Life Sciences*, 2002.
[3] M.E. Taylor, K. Drickamer, *Introduction to Glycobiology*, Oxford, 2004.
[4] J.E. Sadler, Biology of carbohydrates, 1984, **2**, Willey, New York, 199.
[5] F.I. Comer, G.W. Hart, J. Biol. Chem., 2000, **275**, 29179.
[6] M.R. Patt, C.R. Bertozzi, Chem. Soc. Rev., 2005, **34**, 58.
[7] a) B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Theim, *Glycoscience III Chemistry and Chemical Biology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2001, 2257; b) M.E. Taylor, K. Drickamer, *Introduction to Glycobiology*, Oxford University Press, 2003, 15.
[8] a) B. Imperiali, K.L. Shannon, K.W. Rickert, J. Am. Chem., 1992, **114**, 7942; b) A. Vorki, Glycobiology, 1993, **3**, 97.
[9] S. Hanson, M. Best, M.C. Bryan, Ch.H. Wong, TRENDS in Biochemical Sciences, 2004, **29(12)**, 656.
[10] L. Liu, C.S. Bennett, H.H. Wong, Chem. Commun., 2006, 21–33.
[11] C.M. Taylor, Tetrahedron, 1998, **54**, 11317.
[12] M. Spinola, R.W. Jeanloz, J. Biol. Chem. 1970, **245**, 4158.
[13] L.M. Likhosherstov, O.S. Novikova, V.A. Kochetkov, Carbohydr. Res., 1986, **46**, C1.
[14] T. Norberg, B. Lűning, J. Tejbrant, Methods Enzymol., 1994, **247**, 87.

[15] M. Kuraya, S. Hose, J. Biochem., 1992, **112**, 122.
[16] P.E. Dawson, S.B. Kent, Annu. Rev. Biochem., 2000, **69**, 923.
[17] R.B. Trimble, A.L. Tarentino, J. Biol. Chem., 1991, **266**, 1646.
[18] X. Chen, J. Fang, J. Zhang, Z. Liu, J. Shao, P. Kowal, P.Andreana, P.G. Wang, J. Am. Chem. Soc., 2001, **123**, 2081 .
[19] F. Michael, R. Frier, E. Plate, A. Hiller, Chem. Ber., 1952, **85**, 1092.
[20] L. Vĕrtesy, H.-W. Fehlhabert, H. Kogler, P.W. Schindler, Liebigs Ann. Chem., 1996, 121.
[21] C.J. Lote, J.B. Weis, FEBS Letters, 1971, **16**, 81.
[22] C.J. Lote, J.B. Weis, Biochem. J., 1971, **123**, 25p.
[23] H. Suda, T. Aoyagi, T. Takeuchi, H. Umezawa, J. Antibiot., 1973, **26**, 621.
[24] G.L. Gustafson, J.E. Gander, Methods Enzymol., 1984, **107**, 172.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 listopada 2006

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 1-2
PL ISSN 0043-5104

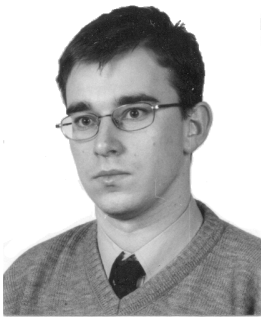
HYDRATACJA PROTONU W ROZTWORZE WODNYM

PROTON HYDRATION IN AQUEOUS SOLUTION

Maciej Śmiechowski, Janusz Stangret

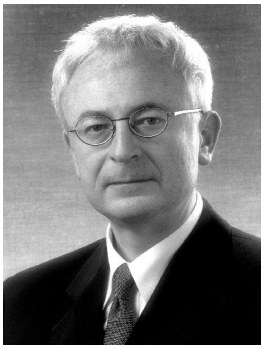
Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Abstract
Wprowadzenie
1. Sfery hydratacyjne protonu w świetle metod chemii obliczeniowej
2. Spektroskopia oscylacyjna wodnych roztworów mocnych kwasów
3. Dyfrakcyjne badania otoczki hydratacyjnej protonu w kryształach i w roztworze wodnym
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Maciej Śmiechowski ukończył studia magisterskie w zakresie ochrony środowiska na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w 2002 r. Wkrótce przystąpi do obrony rozprawy doktorskiej poświęconej hydratacji protonu i jonu hydroksylowego w roztworze wodnym, wykonanej w Katedrze Chemii Fizycznej Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Janusza Stangreta. W czasie trwania studium doktoranckiego odbył staż naukowy w zespole prof. Ingmara Perssona w Szwedzkim Uniwersytecie Rolniczym (SLU), a wkrótce potem uzyskał grant badawczy KBN na dokończenie rozprawy doktorskiej.

Jego zainteresowania naukowe związane są ze zjawiskami hydratacji elektrolitów i nie-elektrolitów w roztworach wodnych, badanymi metodą spektroskopii oscylacyjnej w zakresie podczerwieni, a także metodami chemii obliczeniowej. Jest współautorem 5 publikacji naukowych z zakresu tej tematyki.



Dr hab. inż. Janusz Stangret w roku 1977 ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Od 1978 roku pracuje na Politechnice Gdańskiej. W roku 1983 uzyskał stopień doktora, a w 2000 doktora habilitowanego. Obecnie jest profesorem nadzwyczajnym w Katedrze Chemii Fizycznej PG.

Specjalność – chemia fizyczna roztworów, spektroskopia oscylacyjna.

ABSTRACT

The phenomena behind proton hydration in aqueous solution are still far from being fully understood and have attracted scientific attention for many decades now. This article reviews the current state of studies of this seemingly simple system, focusing particularly on the most popular techniques applied: computational chemistry, vibrational spectroscopy and diffraction methods.

The picture of proton transfer via the Grotthuss mechanism (Fig. 1) [8], has lately been critically examined basing on up-to-date experimental and computational data [7], but it is still found relevant in biological systems, e.g. in proton-transferring proteins [4].

The lengthy and heated debate on the identity of hydrated proton in an aqueous solution [6, 11, 12] has focused for many years on two isomeric structures (Fig. 2), the so-called „Eigen cation" [10] and „Zundel cation" [11]. The findings of the last decade have proved that these two forms coexist in a dynamic equilibrium [5, 13–25], and that the answer to this problem may as well be in the middle [26–28]. The most recent reports from the last few years are reviewed here in considerable detail.

Keywords: proton hydration, aqueous solutions, hydrogen bonding, vibrational spectroscopy, diffraction methods, quantum-mechanical calculations

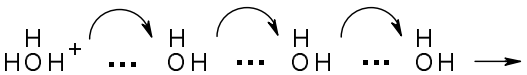
Słowa kluczowe: hydratacja protonu, roztwory wodne, wiązanie wodorowe, spektroskopia oscylacyjna, metody dyfrakcyjne, obliczenia kwantowo-mechaniczne

WPROWADZENIE

Proton, z uwagi na swoje szczególne znaczenie w chemii roztworów wodnych, chemii atmosfery, biochemii i technologii chemicznej, od wielu lat stanowi przedmiot licznych naukowych dociekań [1]. Szczególne aspekty tego zagadnienia, jak reakcje z udziałem kwasów i zasad, czy kataliza kwasowo-zasadowa doczekały się własnych, obszernych monografii [2, 3]. Ogromnym zainteresowaniem cieszy się także zagadnienie roli protonu w układach biologicznych, zwłaszcza poznanie mechanizmów jego transportu [4].

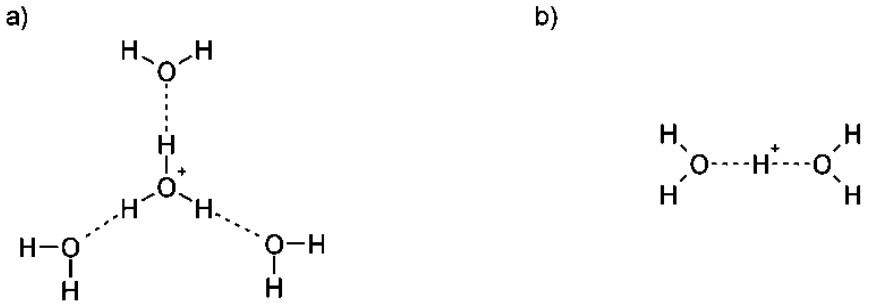
Wiele wskazuje na to, że struktura sfer hydratacyjnych protonu w roztworze wodnym jest unikalna na tle innych indywiduów chemicznych. Proton w wodzie tworzy natychmiast kowalencyjnie związane kompleksy o zmiennej stechiometrii z cząsteczkami H_2O. Struktura wodnych kompleksów protonu wciąż nie jest jednoznacznie ustalona, a ponadto wiele wskazuje na to, że w roztworze kompleksy te dynamicznie fluktuują pomiędzy różnymi strukturami granicznymi [5]. Nawet stechiometria hydratowanego protonu jest wciąż kwestią sporną. Choć utarło się pisanie w podręcznikach chemii ogólnej wzoru jonu H_3O^+ (nazywanego różnie: jonem *hydroniowym* lub *oksoniowym*, lub nawet *wodorowym*) [6], na oznaczenie wodnego kompleksu protonu, powszechnie wciąż używany jest symbol H^+, ale także inne, np. $H_9O_4^+$.

Ogromna ruchliwość jonowa protonu, niemal o rząd wielkości większa od pozostałych kationów, wymaga odwołania się do szczególnego mechanizmu jego przenoszenia w wodzie, innego niż dla pozostałych indywiduów jonowych. Najprawdopodobniej ważną rolę odgrywa tu złożony mechanizm transferu protonu pomiędzy cząsteczkami wody, tzw. mechanizm Grotthussa (Rys. 1) [7], wymuszający specyficzną lokalną strukturę kompleksu hydratacyjnego. Von Grotthuss, z oczywistych względów, nie mógł być autorem owego mechanizmu w obecnym sformułowaniu (chociażby dlatego, że nie znał pojęcia protonu), jednak to jemu przyznaje się palmę pierwszeństwa za próbę wyjaśnienia zjawiska przewodnictwa w roztworach elektrolitów przy pomocy teorii „łańcuchów" wodnych [8]. Mechanizm Grotthussa, rozumiany jako ciąg sprzężonych „przeskoków" protonu między cząsteczkami wody, jest obecnie krytykowany na rzecz migracji całej struktury solwatacyjnej [7]. Dodatkowo, z uwagi na niewielką masę i wymiary protonu, jego ruch nie daje się opisać wyłącznie za pomocą praw mechaniki klasycznej. Konieczne jest uwzględnienie efektów kwantowych dla wyjaśnienia zjawiska tunelowania protonu pomiędzy cząsteczkami wody [9].



Rysunek 1. Schemat mechanizmu Grotthussa w postaci sprzężonych aktów elementarnych transferu pojedynczego protonu pomiędzy cząsteczkami wody [7]

W powszechnie przyjętym obecnie obrazie sfer hydratacyjnych protonu w wodzie rozważane są dwie struktury graniczne kationu H^+_{aq}, a mianowicie tzw. „kation Eigena" (**E**) i „kation Zundela" (**Z**). Model Eigena zakłada istnienie jonu H_3O^+ z trzema równocennymi atomami wodoru, zaangażowanymi w trzy wiązania wodorowe z cząsteczkami wody. Kation ten bywa często zapisywany wraz z pierwszą sferą hydratacyjną jako $H_9O_4^+$ (Rys. 2a) [10]. Zaproponowany po raz pierwszy przez Zundela kation $H_5O_2^+$ charakteryzuje się natomiast obecnością dodatkowego protonu, współdzielonego przez dwie cząsteczki H_2O i znajdującego się idealnie pośrodku pomiędzy nimi (Rys. 2b) [11].



Rysunek 2. Główne modele struktury hydratowanego protonu:
(a) „kation Eigena" (**E**) H_3O^+ (wraz z kompletną pierwszą sferą hydratacyjną) [10];
(b) „kation Zundela" (**Z**) $H_5O_2^+$ (bez dalszych sfer hydratacyjnych) [11]

Mniej więcej do lat dziewięćdziesiątych XX w. dominował w literaturze przedmiotu pogląd, że tylko jeden z tych modeli stanowi właściwy obraz struktury i zachowania się hydratowanego protonu w roztworze wodnym, a kwestia ta bywała przedmiotem ożywionych debat [6, 12]. Jednak w ostatnich latach pojawia się coraz więcej prac teoretycznych i eksperymentalnych, dowodzących bądź to istnienia dynamicznej równowagi pomiędzy tymi strukturami granicznymi [5, 13–25], bądź też obecności w roztworze przede wszystkim form pośrednich pomiędzy tymi dwiema formami [26–28]. Wielu autorów wskazuje także, że rozróżnienie pomiędzy kationami typu **Z** i typu **E** zależy w dużym stopniu od arbitralnych założeń [14, 20, 23, 26, 28].

Mimo pozornej prostoty rozważanych układów oraz długoletniej historii dociekań naukowych na ich temat, liczba publikacji w literaturze światowej, poświęconych problematyce hydratowanego protonu, bynajmniej nie maleje, a w ciągu ostatnich kilku lat wykazuje wręcz tendencję rosnącą. W niniejszej pracy prag-

niemy przybliżyć bieżący stan badań nad tym zagadnieniem, ze szczególnym uwzględnieniem najnowszych osiągnięć. Dokładniej zostaną omówione najpopularniejsze ze stosowanych metod badawczych, tj. chemia obliczeniowa, spektroskopia oscylacyjna oraz metody dyfrakcyjne.

1. SFERY HYDRATACYJNE PROTONU W ŚWIETLE METOD CHEMII OBLICZENIOWEJ

Pierwszą systematyczną eksplorację powierzchni energii potencjalnej kompleksów $H_3O^+(H_2O)_n$ (n = 0–4) drogą obliczeń kwantowo-mechanicznych *ab initio* znaleźć można w pracy Newtona i Ehrensona [29]. Mimo bardzo ubogiej bazy i poziomu teorii (HF/4–31G), przewidywała ona wiele właściwości takich układów, m.in. istnienie kompleksu $H_5O_2^+$ o symetrii D_{2d}. Do chwili obecnej do badania struktury hydratowanego protonu stosowano wiele różnych metod obliczeń *ab initio* [13, 14, 27, 29–34] lub opartych o teorię funkcjonałów gęstości (ang. *Density Functional Theory*, DFT) [17, 27, 34–38]. Statyczny obraz zjawiska hydratacji, wynikający z tych obliczeń, wzbogacony został o informacje dotyczące dynamiki procesu transferu protonu uzyskane dzięki symulacjom metodą Monte Carlo (MC) [28, 37, 39] oraz metodami dynamiki molekularnej (MD) [5, 9, 15–20, 23, 26, 35, 40].

Centrum kationu **E**, czyli monohydrat protonu H_3O^+, według niektórych autorów, wykazuje minimum energetyczne dla struktury płaskiej (D_{3h}), czyli odmiennej od izoelektronowego NH_3 [29]. Jednak zarówno nowsze doniesienia dotyczące obliczonych struktur [32, 33, 35, 38], jak i dane eksperymentalne [41] wskazują zdecydowanie na budowę piramidy trygonalnej (C_{3v}).

Z obliczeń kwantowomechanicznych z uwzględnieniem korelacji elektronowej wynika, że kompleks $H_3O^+{\cdot}H_2O$ ma strukturę symetryczną typu kationu Zundela, tj. $H_5O_2^+$, o symetrii C_2 [13, 14, 27, 29, 31, 32, 35, 36, 38]. Jego geometria tylko w minimalnym stopniu zależy od poziomu teorii oraz bazy orbitali atomowych przyjętych w obliczeniach. Odległość O···O wynosi ok. 2,4 Å, zaś kąt O···H···O ok. 173–174°. Proton umiejscowiony jest symetrycznie pomiędzy dwoma atomami tlenu i jest na nim zlokalizowana większość ładunku dodatniego kompleksu. Metody *ab initio* o różnym poziomie korelacji elektronowej i metody DFT dają zasadniczo ten sam obraz struktury kationu **Z**, ale te ostatnie dają błędny obraz powierzchni energii potencjalnej dla transferu centralnego protonu (z wyjątkiem niektórych funkcjonałów tzw. hybrydowych) [34]. Uwzględnienie w obliczeniach zewnętrznego pola rozpuszczalnika w postaci kontinuum, charakteryzowanego stałą dielektryczną (ang. *Polarizable Continuum Model*, PCM), prowadzi do interesującego wniosku, że w fazie ciekłej następuje nieznaczne złamanie symetrii kompleksu i przesunięcie centralnego protonu ku jednemu z atomów tlenu [27].

W przypadku dalszych hydratów protonu ($H^+(H_2O)_n$, $n > 2$), sytuacja nie jest już tak jednoznaczna: wyniki zależą od metody obliczeń i użytej bazy, a większość układów wykazuje izomerię geometryczną. Bardzo często jest to izomeria pomię-

dzy formami **Z** i **E**, która występuje zwykle dla parzystej liczby cząsteczek wody hydratacyjnej (n = 4, 6). I tak, rozszerzony kompleks Eigena $H_9O_4^+$ wykazuje minimum energetyczne zarówno w postaci $H_3O^+{\cdot}3H_2O$ [13, 27, 29, 32, 33, 35, 38], jak i w postaci $H_5O_2^+{\cdot}2H_2O$ [13, 27, 29, 35]. Pierwszy z tych kompleksów stanowi najprawdopodobniej minimum globalne. Podobna izomeria została potwierdzona dla n = 6, jednak w tym przypadku różnica energetyczna pomiędzy obiema formami jest już bardzo niewielka [13, 27, 35].

Dla większych układów powierzchnia energii potencjalnej staje się coraz bardziej złożona i tak: dla $H^+(H_2O)_5$ znaleziono 5 minimów lokalnych [37], dla $H^+(H_2O)_7$ – 4 [17], natomiast dla $H^+(H_2O)_8$ – 3 [17], a w niezależnie wykonanych przez nas obliczeniach kolejne 3, o zupełnie innej geometrii [27]. Dodatkowy proton występuje w dużych klasterach zarówno w położeniu w przybliżeniu symetrycznym, jak i asymetrycznym względem dwóch atomów tlenu, choć w większych kompleksach złamanie symetrii [17, 27] następuje zawsze. Największe, jak dotąd teoretycznie przebadane klastery wodne protonu to $H^+(H_2O)_{20}$ oraz $H^+(H_2O)_{21}$ [14]. Proton zawsze występuje w nich na powierzchni klastera, a nie w klatce zbudowanej z cząsteczek wody hydratacyjnej, przy czym można zaobserwować obydwie jego formy, **E** oraz **Z**. Z tego powodu niektórzy autorzy określają kation H_3O^+ jako indywiduum „pseudo-amfifilowe" [19].

Gdy kompleks $H^+(H_2O)_n$ umieszczono w rozpuszczalniku symulowanym jako zewnętrzne kontinuum, według tzw. modelu kawitacji, minimum energetyczne zawsze stanowiła forma **E** [33]. Z kolei, według modelu PCM zostały przez nas obliczone geometrie dwóch izomerów dla n = 4 i 6: jednego typu **E** oraz drugiego, stanowiącego formę pośrednią, ale bliższego kationowi typu **Z** [27].

Głębszy wgląd w dynamikę zjawisk hydratacji i transportu protonu dają metody komputerowej symulacji faz ciekłych. Do badania opisywanego układu stosowano m.in. metodę MC [28, 37, 39], symulacje kwantowo-klasyczne [15], dynamikę molekularną Borna-Oppenheimera (BOMD), opartą o DFT z bazą orbitali atomowych typu Gaussa [17, 26, 35], dynamikę molekularną Cara-Parinello (CPMD), opartą o DFT z bazą orbitali atomowych typu fal płaskich [5, 9, 16, 18, 40] oraz dynamikę molekularną opartą o metodę empirycznych wiązań walencyjnych (ang. *Empirical Valence Bond*, EVB) [19, 20, 23].

W części opisanych w literaturze symulacji zdecydowanie dominującą formę protonu stanowi kation typu **E**, co wynika przede wszystkim z założeń dotyczących struktury kompleksu przyjętych w obliczeniach kwantowo-klasycznych [15] lub metodą MC [39]. Kation typu **Z** może wówczas powstawać jedynie przejściowo, podczas wymiany cząsteczek wody w pierwszej sferze hydratacyjnej kationu **E** [15]. W symulacjach MC udało się natomiast zidentyfikować 4 kolejne sfery hydratacyjne wokół kationu H_3O^+ [39].

Proporcje udziału form **E** i **Z** w roztworze wodnym na gruncie symulacji dynamicznych pozostają kwestią sporną. Szczegółowe obliczenia metodą CPMD dla układu zawierającego 32 cząsteczki wody hydratacyjnej sugerują, że w czasie symu-

lacji około 60% analizowanych konfiguracji zawierało centralny kation **E**, a pozostałe – kompleks symetryczny typu **Z** [5]. Podobne wyniki osiągnięto tą samą metodą w późniejszej pracy dla stężonych roztworów HCl, gdzie podano dystrybucję klasterów $H^+(H_2O)_n$ (n = 1–5) dla układu 12 cząsteczek HCl i 113 cząsteczek H_2O [16]. Forma **Z** stanowiła ok. 30% ogółu konfiguracji [16]. Autorzy zakładają, że w roztworze wodnym zawierającym dodatkowy proton mamy do czynienia z silnie sprzężoną siecią wiązań wodorowych, a nie z konkretnymi przypadkami granicznymi struktury kationu. Niektórzy autorzy wskazują, że odsetek obserwacji kompleksu **Z** w czasie trwania symulacji zależy od przyjętych arbitralnych kryteriów granicznych [20]. Jeśli za warunek istnienia takiego kompleksu przyjąć fakt zajścia transferu protonu w czasie kroku obserwacji, wówczas odsetek ten zmieniał się od 13% (dla kroku 5 fs) do 85% (dla kroku 500 fs). Jeśli zaś stosowano wyłącznie kryterium geometryczne (R_{OO} < 2,45 Å) wynosił on 43% podobnie jak dla symulacji CPMD [20].

Szczególną rolę w procesie transferu protonu odgrywa istnienie tzw. „wiązania specjalnego". To wiązanie wodorowe łączy kation H_3O^+ z cząsteczką H_2O nie wykazującą pełnej tetragonalnej sieci wiązań wodorowych [5]. Pojawienie się go (często wskutek zerwania wiązania wodorowego z drugą sferą hydratacyjną [7]) towarzyszy transferowi protonu na cząsteczkę H_2O zaangażowaną w wiązanie specjalne, przy czym proces ten jest często odwracalny (proton oscyluje pomiędzy dwiema tymi samymi cząsteczkami H_2O) [20]. Mechanizm Grotthussa polegałby na przeniesieniu wiązania specjalnego poprzez sieć wiązań wodorowych wody [20]. Fluktuacje kwantowe nie zmieniają zasadniczo obrazu ruchu protonu w kationie **Z** [9].

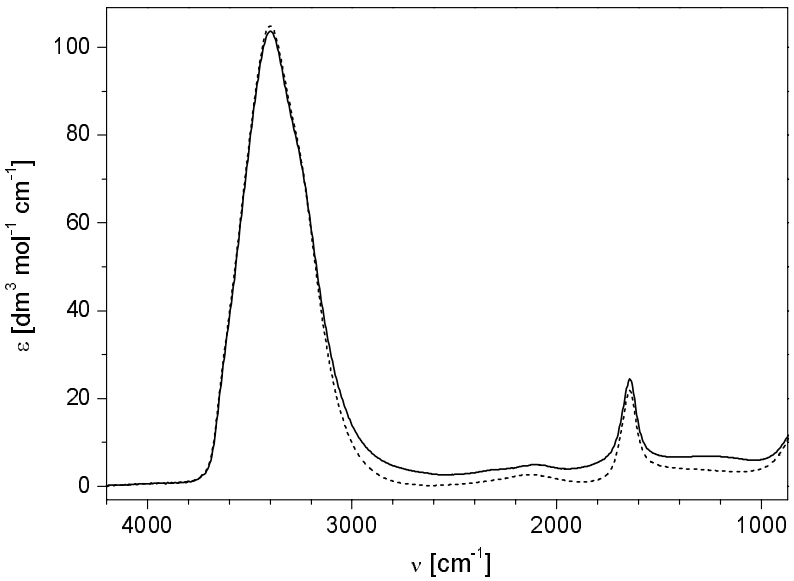
W bardzo niedawnej symulacji metodą *ab initio* MD dominujący kompleks protonu miał formę kationu typu **Z** o złamanej symetrii – proton był minimalnie przesunięty w stronę jednego z atomów tlenu, zaś odległość tlen–tlen wynosiła 2,44–2,45 Å [26]. Inni autorzy w celu wyjaśnienia swych obserwacji również proponowali struktury pośrednie. Określane były jako „asymetryczny kompleks $H_5O_2^+$" [20] lub też jako „zniekształcony Eigen" i „zniekształcony Zundel" [28]. Proporcja kationów zniekształconych do pełnego kationu typu **E** wynosi 75:25 [28].

Przedmiotem obliczeń często były także widma oscylacyjne (zwykle widma gęstości stanów, ang. *Density Of States*, DOS) układów modelowych zawierających dodatkowy proton, które można otrzymać przez transformację Fouriera funkcji autokorelacji momentu dipolowego [15, 17–20, 23, 40]. Widmo oscylacyjne klasterów protonowanych różni się znacznie od widma czystej wody, przede wszystkim w zakresie niskich częstości drgań. Drgania wewnątrz klastera $H_9O_4^+$ typu **E** leżą w zakresie 2500–3150 cm^{-1} [17–20], zaś centralnego protonu układu $H_5O_2^+$ przy częstościach jeszcze niższych: 1000–1800 cm^{-1} [17–20].

Podjęto też próbę korelacji eksperymentalnych widm oscylacyjnych roztworów HCl i DCl z widmami obliczonymi teoretycznie i otrzymano zadowalającą zgodność kształtu widm różnicowych [23]. Wg autorów pracy [40], w stężonych roztworach kwasów obecność anionu może być także odpowiedzialna za omówioną poniżej absorpcję typu kontinuum.

2. SPEKTROSKOPIA OSCYLACYJNA WODNYCH ROZTWORÓW MOCNYCH KWASÓW

Charakterystyczną cechą wyróżniającą roztwory wodne jonów H^+ są tzw. „kontinua" absorpcyjne w widmach oscylacyjnych (Rys. 3). Nazwą tą określa się szerokie, słabo ustrukturyzowane i dosyć intensywne pasma absorpcyjne w zakresie ok. 1000–3200 cm^{-1}, pojawiające się w widmach w podczerwieni wodnych roztworów kwasów [11].



Rysunek 3. Widma oscylacyjne (w skali molowego współczynnika absorpcji) roztworu wodnego HCl ($m = 0{,}996$ mol·kg^{-1}; linia ciągła) oraz czystej H_2O (linia przerywana) wykonane techniką ATR [42]

Pomiar widm oscylacyjnych wymienionych roztworów wykonywano zarówno w tradycyjnej technice transmisyjnej [43–45], w technice osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. *Attenuated Total Reflectance*, ATR) [23, 42, 46–48], jak i w technice odbicia zwierciadlanego [49]. Opublikowano też widma transmisyjne HDO rozcieńczonej izotopowo w H_2O [27, 50]. Wielokrotnie dokonywano także pomiaru widm Ramana roztworów kwasów [51–53]. Gamę metod badawczych, zastosowanych w analizie tych układów, uzupełniają spektroskopia w podczerwieni filmów cieczy otrzymywanych *in vacuo* [54], czasowo-rozdzielcza femtosekundowa spektroskopia oscylacyjna [24, 55] oraz spektroskopia oscylacyjna wydzielonych metodą spektrometrii mas klasterów $H^+(H_2O)_n$ w fazie gazowej [21, 22, 56].

Interpretacja molekularna kontinuum absorpcyjnego nie jest sprawą prostą. Według Zundela i współautorów [11, 45], jego pojawienie się miałoby być związane

z łatwością tunelowania protonu wzdłuż symetrycznego wiązania wodorowego (w kompleksie typu $H_5O_2^+$), w wyniku bardzo wysokiej polaryzowalności tego wiązania. Autorzy wskazują na trzy efekty odpowiedzialne za fakt, iż poziomy energetyczne protonu w studni potencjału pomiędzy dwoma atomami tlenu zyskują strukturę pasmową: (*1*) wzajemne sprzężenie oscylatorów OH w układzie silnych wiązań wodorowych (protonowe siły dyspersyjne); (*2*) oddziaływanie z polem elektrycznym pochodzącym od anionu lub dipoli indukowanych cząsteczek wody; (*3*) sprzężenie oscylatora OH polaryzowalnego wiązania z międzycząsteczkowymi drganiami otaczającego rozpuszczalnika o niskiej częstości.

Kwantowomechaniczna teoria efektu (*3*), zastosowana do układów zawierających tylko izotop H lub D, została podana przez Marechala i Witkowskiego [57, 58]. Z teorii tej wynika, że sprzężenie anharmonicznych drgań rozciągających O-H(D) z drganiami mostka wiązania wodorowego O-H(D)···O w wysokim stopniu determinuje występowanie szerokich pasm typu kontinuum w widmach oscylacyjnych układów zasocjowanych poprzez wiązania wodorowe. Istotny wpływ na strukturę tych pasm ma także udział rezonansu Fermiego, głównie wskutek sprzężenia drgań rozciągających O-H z drganiami zginającymi, które wzrasta dla silnych wiązań wodorowych [59].

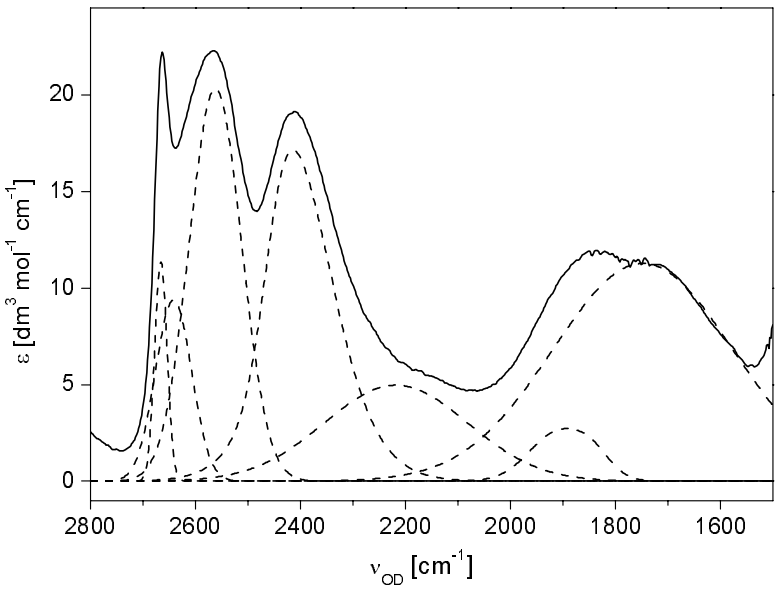
Niektórzy autorzy, dla lepszego wytłumaczenia wpływu efektu (*3*) na kształt widma oscylacyjnego, przywołują widmo elektronowe zanieczyszczenia w krysztale, które składa się z wąskiego pasma „zerowego fononu" (czyste przejście elektronowe) oraz szerokiego pasma bocznego powstającego na skutek oddziaływania z fononami. Analogiczny mechanizm miałby funkcjonować w wodnych roztworach kwasów. Wzbudzenia fononowe w takim przypadku stanowią drgania cząsteczek rozpuszczalnika o niskiej częstości (w wodzie są to głównie zahamowane rotacje i translacje) [46].

Przejście odpowiadające „zerowemu fononowi", tj. drganiu protonu w symetrycznej studni potencjału, w widmie oscylacyjnym roztworów wodnych widoczne jest przy ok. 1200 cm^{-1} [23, 42, 46]. W izolowanym klasterze $H_5O_2^+$ ma ono częstość 1085 cm^{-1} [22, 56]. Warto dodać, że widma oscylacyjne klasterów $H^+(H_2O)_n$ są bardzo czułe na zmianę wartości *n* i wykazują przy tym znaczące przesunięcia pasm. Porównanie widm z obliczonymi strukturami wskazuje, że zależnie od liczby cząsteczek wody hydratacyjnej, mamy do czynienia z kompleksem Zundela bądź Eigena [21, 22, 56]. Znacząca redystrybucja ładunku przy zmianie struktury i symetrii kompleksu wywołuje ogromne zmiany w widmie [22].

Również kontinuum absorpcyjne w roztworach wodnych jest zależne od obu struktur granicznych hydratowanego protonu. Niedawno opublikowane symulacje teoretyczne, poparte danymi eksperymentalnymi, wskazują na stan równowagi dynamicznej pomiędzy kompleksami **Z** i **E** w niezbyt stężonych wodnych roztworach kwasów [23, 40]. Okazuje się, że intensywność kontinuum poniżej ok. 1500 cm^{-1} związana jest wyłącznie z obecnością struktury **Z**, podczas gdy w obszarze 1500–3000 cm^{-1} za kontinuum odpowiadają obydwa izomery graniczne [40].

Przy zastosowaniu opracowanej w naszym zespole tzw. metody widm różnicowych do analizy widm H_2O w roztworach mocnych kwasów, możliwa była dekompozycja widma absorpcyjnego w obszarze kontinuum na niewielką liczbę analitycznych pasm składowych [42]. Najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem obecności kontinuum absorpcji jest sprzężenie międzycząsteczkowego ruchu protonu w (prawie) symetrycznej studni potencjału z niskoenergetycznymi oscylacjami sieci wiązań wodorowych wody, typu zahamowanych rotacji i translacji. Sprzężenia oscylatorów cząsteczek wody w tego typu oddziaływaniach mają charakter dalekozasięgowy [42].

Wielu autorów, zwłaszcza we wcześniejszym okresie badań hydratacji protonu, optowało wyłącznie za obecnością kompleksu typu **E** w wodnych roztworach kwasów [6, 43, 51, 52]. Pasma ramanowskie w widmach stężonych roztworów przypisywano odpowiednim drganiom normalnym jonu H_3O^+ [51, 52], którego widmo oscylacyjne zostało wcześniej dobrze poznane [60]. Dziś wiadomo jednak, że ewentualne drgania normalne kompleksów mogą się uwidaczniać wyłącznie jako słabe pasma na tle absorpcji typu kontinuum, u podłoża której leży zupełnie inny, omówiony wyżej mechanizm [46].



Rysunek 4. Widmo HDO zaburzonej przez HPF_6 w roztworze wodnym w zakresie drgania OD i jego rozkład na analityczne pasma składowe (linie przerywane) [27]

Spektroskopia oscylacyjna izotopowo rozcieńczonej HDO pozwala na efektywne rozprzężenie sprzężeń oscylatorów obecnych w układzie, umożliwia zatem separację struktury solwatacyjnej protonu od kontinuum. Mimo to w badaniach wodnych roztworów kwasów była stosowana bardzo rzadko [27, 50]. Zawada i Dryjań-

ski, po drobiazgowej analizie konturu pasma drgań rozciągających OD w zakresie 2100–2700 cm^{-1}, potwierdzili zdecydowaną przewagę formy **Z** w roztworze [50]. W naszej pracy zastosowaliśmy ilościową wersję metody widm różnicowych i zauważyliśmy, że mimo nieobecności kontinuum, pasmo OD rozciąga się nietypowo ku niskim częstościom, bo aż do ok. 1600 cm^{-1} (Rys. 4) [27]. Empiryczna korelacja położenia pasma z odległością O···O oraz z obliczonymi strukturami pozwoliła nam potwierdzić przewagę zdeformowanego kompleksu Zundela, „w pół drogi" pomiędzy strukturami granicznymi **Z** i **E**. Odległość O···O wewnątrz takiego kationu $H_5O_2^+$ wynosi 2,435 Å, przy skrajnie niskim położeniu pasma OD HDO (ok. 1700 cm^{-1}). Możliwe też było scharakteryzowanie pod względem strukturalnym i energetycznym dalszych trzech sfer hydratacyjnych asymetrycznego kationu **Z**. Odpowiadające im położenia pasm oraz odległości O···O między kolejnymi sferami wynosiły 2200 cm^{-1} i 2,610 Å, 2420 cm^{-1} i 2,760 Å oraz 2530 cm^{-1} i 2,875 Å. Ponadto widoczna była zewnętrzna sfera hydratacyjna współdzielona z anionem [61] (> 2600 cm^{-1} i > 3,00 Å, zależnie od anionu), a niezależnie można było wyróżnić dodatkowy (szósty) stan cząsteczek wody słabo oddziałujących z wolnymi parami elektronowymi H_2O w pierwszej sferze hydratacyjnej protonu. Praca ta stanowi pierwszą tak szeroko zakrojoną charakterystykę strukturalną otoczenia protonu, zwłaszcza dalszych sfer hydratacyjnych, trudnych do zbadania innymi metodami.

Femtosekundowa spektroskopia oscylacyjna rozdzielcza w czasie jest obecnie niezwykle szybko rozwijającą się metodą badawczą i była już stosowana w badaniach nad hydratowanym protonem [24]. Wcześniej odkryto, że wzbudzenie oscylatora OH $v = 0 \rightarrow 2$ (v – oscylacyjna liczba kwantowa) może być odpowiedzialne za międzycząsteczkowy transfer protonu w wodzie ciekłej. W stanie $v = 2$ proton jest zdelokalizowany pomiędzy dwoma atomami tlenu, podobnie jak w kompleksie **Z**, i możliwy jest jego transfer z jednego atomu tlenu na drugi. Transfer protonu w roztworach kwasów może zachodzić w podobny sposób [55]. W najnowszej pracy obserwowano interkonwersję pomiędzy formami **E** i **Z** hydratowanego protonu, która zachodzi w niezwykle krótkim czasie (< 100 fs). Czas charakterystyczny drgania rozciągającego protonu jest krótszy od wszystkich innych oscylacji w wodzie ciekłej i wynosi 120 fs [24]. Wyniki te potwierdzają niezwykle krótką skalę czasową procesu transferu protonu, wcześniej ujawnioną metodami teoretycznymi [20].

3. DYFRAKCYJNE BADANIA OTOCZKI HYDRATACYJNEJ PROTONU W KRYSZTAŁACH I W ROZTWORZE WODNYM

Kation H_3O^+ został w pełni zidentyfikowany wiele lat temu w strukturze krystalicznej monohydratu kwasu nadchlorowego [62]. Na podstawie ogromnej liczby dostępnych dziś danych dyfrakcyjnych można stwierdzić, że ma on budowę piramidy trygonalnej, z praktycznie tetraedrycznym kątem HOH (109–112°) oraz długością wiązania OH wynoszącą ok. 1,02 Å [63]. Kation Zundela $H_5O_2^+$ zidentyfiko-

wano drogą rentgenowskiej analizy strukturalnej m.in. w dihydracie kwasu nadchlorowego, di- i trihydracie chlorowodoru [64] oraz metodą dyfrakcji neutronów w dihydracie bromowodoru [65]. Odległość O···O w tym kationie wynosi ok. 2,40–2,43 Å, przy czym proton usytuowany jest pośrodku lub niemal pośrodku między dwoma atomami tlenu. W stanie stałym kation taki może być stabilizowany energią pola krystalicznego.

„Pełny" kation Eigena ($H_9O_4^+$) był również badany metodami dyfrakcyjnymi w stanie krystalicznym [66]. Długość wiązania wodorowego pomiędzy centralnym jonem H_3O^+ a cząsteczkami H_2O w pierwszej sferze hydratacyjnej wykazywała duże zróżnicowanie, od 2,514 Å do 2,57 Å [66]. Jeszcze większe agregaty wodne z dodatkowym protonem zostały przebadane w mniejszym stopniu. I tak, w strukturze $H_{13}O_6^+FeCl_4^-$, opublikowanej przez Gustafssona, można było wyróżnić 5 dłuższych wiązań wodorowych (2,661–2,742 Å) i nie można było wskazać dyskretnego kompleksu proton–woda [67]. Nowsze doniesienie o kationie $H_{13}O_6^+$, zamkniętym w klatce zbudowanej z trzech cząsteczek eteru koronowego, wskazywało na strukturę typu $H_9O_4^+{\cdot}2H_2O$, tj. H_3O^+ z pełną pierwszą i częściową drugą sferą hydratacyjną. Długości wiązań wodorowych do pierwszej i drugiej sfery hydratacyjnej wynosiły odpowiednio 2,51 oraz 2,62 Å [68].

Na podstawie danych pochodzących z analizy strukturalnej monokryształów stwierdzić można, że w miarę wzrostu liczby cząsteczek wody hydratacyjnej, centralny kation z udziałem protonu przyjmuje strukturę coraz bardziej przypominającą kompleks **E**, z jednoczesnym wzrostem długości wiązań wodorowych w pierwszej sferze hydratacyjnej.

Dyfrakcja promieni Rentgena i neutronów jest z powodzeniem wykorzystywana od wielu lat w badaniach nad wodą i roztworami wodnymi, dając możliwość bezpośredniego wglądu na poziomie molekularnym w rozkład odległości międzyatomowych w badanych układach [69]. Specyfika badań dyfrakcyjnych nie pozwala, niestety, na badanie roztworów o stężeniu mniejszym niż ok. 1 $mol{\cdot}dm^{-3}$, a zatem wciąż nazbyt stężonych.

Struktura hydratowanego protonu w roztworze wodnym została zbadana zarówno metodami dyfrakcji rentgenowskiej [70–75], jak i neutronów [28, 76, 77]. Interpretację wyników tych pomiarów niemal zawsze dokonywano w oparciu o założoną strukturę kompleksu typu **E**, $H_9O_4^+$ [70–77]. Wiązania wodorowe pomiędzy centralnym kationem a trzema cząsteczkami H_2O w pierwszej sferze hydratacyjnej były krótkie, lecz ich długość znacznie zależała od stężenia roztworu. Dla stężonych roztworów kwasów wahała się ona w granicach 2,44–2,52 Å [70–74, 77]. Jeśli natomiast stężenie roztworu było umiarkowane i nie przekraczało ok. 2 $mol{\cdot}dm^{-3}$, długość tych wiązań wynosiła zwykle ok. 2,75 Å [73, 75, 76]. W części prac wskazano dodatkowo na istnienie czwartej cząsteczki wody w kompleksie wokół H_3O^+ [70, 71, 77]. Jest ona luźno związana z centralnym atomem tlenu kationu H_3O^+ i leży w odległości większej niż trzy cząsteczki wody tworzące kation $H_9O_4^+$ (odległość O···O wynosi ponad 2,9 Å [71, 77]). Na podstawie niedawnych pomiarów neutronograficznych stwierdzono, że zorientowanie tej dodatkowej cząsteczki H_2O nie

pozwala na utworzenie wiązania wodorowego z H_3O^+, mamy zatem do czynienia z oddziaływaniem jon–dipol, typowym dla hydratowanych kationów [77]. Dokonana później przez tych samych autorów reinterpretacja wyników eksperymentalnych prowadzi do wniosku, że w roztworze wodnym współistnieją różnego typu kompleksy, których struktura waha się pomiędzy „zdeformowanym **Z**" a „zdeformowanym **E**" [28].

Dostępność synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego umożliwia także, oprócz badań dyfrakcyjnych, precyzyjny i powtarzalny pomiar widma absorpcyjnego wody ciekłej w zakresie powłoki K atomów tlenu metodą rentgenowskiej spektroskopii absorpcyjnej (ang. *X-ray Absorption Spectroscopy*, XAS) [78]. Widma XA są czułe na zaburzenia dystrybucji gęstości elektronowej wskutek oddziaływań elektrostatycznych oraz zniekształceń sieci wiązań wodorowych w wodzie. Najnowsze prace z tego zakresu dotyczą wodnych roztworów HCl [25]. Różnica w obliczonym teoretycznie widmie XA pomiędzy formami **Z** i **E** hydratowanego protonu wynika przede wszystkim z odmiennego sposobu lokalizacji ładunku dodatniego, który jest silnie zdelokalizowany pomiędzy trzy równocenne atomy wodoru w kompleksie typu **E** oraz w dużym stopniu zlokalizowany na centralnym protonie w kompleksie typu **Z**. Dominacja formy **E** w analizie danych dyfrakcyjnych staje się jasna, gdy uwzględni się fakt, że przeważa ona w stężonych roztworach kwasów, podczas gdy w roztworach bardziej rozcieńczonych występuje przede wszystkim forma **Z** [25].

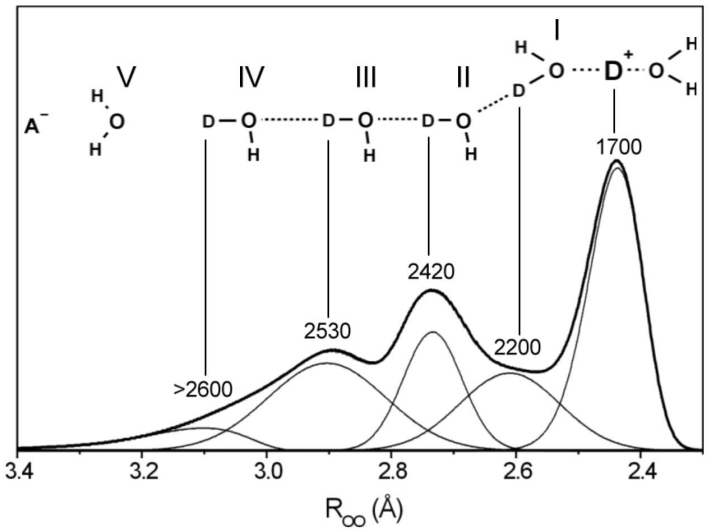
PODSUMOWANIE

W roku 2006 upłynęło dwieście lat od opublikowania przez Grotthussa jego przełomowej pracy, w której postawił niezwykle ciekawą i wyprzedzającą swoje czasy hipotezę o sprzężonym ruchu atomów wodoru i tlenu wzdłuż łańcucha utworzonego przez cząsteczki wody w procesie jej elektrolizy [8]. Zapomniana na 100 lat, została ponownie odkryta w początkach XX stulecia, gdy zaszła konieczność wyjaśnienia niezwykle wysokiej granicznej przewodności jonowej protonu w roztworze wodnym. Do chwili obecnej uległa wielu modyfikacjom [7], pozostając wszakże dobrym punktem odniesienia do dyskusji zjawiska transferu protonu w układach biologicznych [4].

Poznanie hydratacji protonu jest istotne w wielu ważnych z praktycznego punktu widzenia dziedzinach chemii. Transfer protonu poprzez kanały wodne w wyspecjalizowanych białkach (np. bakteriorodopsynie) pełni fizjologicznie ważną rolę w organizmach żywych [4]. Agregaty wodne protonu występują także w atmosferze ziemskiej (m.in. w stratosferze), a ich dokładne zbadanie w układach modelowych jest istotne z punktu widzenia ekologii [32, 54].

Nasza wiedza o hydratacji i transporcie protonu w roztworze i w ciele stałym ulega stałemu wzbogaceniu. Mechanizm transportu protonu wspomagany przez reorganizację rozpuszczalnika jest obecnie dobrze poznany [79]. Szczegółowa struk-

tura sfer hydratacyjnych protonu w roztworze wciąż jednak stanowi temat rozlicznych prac badawczych. Liczące sobie już 50 lat koncepcje Eigena [10] i Zundela [11] wciąż znajdują zastosowanie w objaśnieniu wyników eksperymentalnych, lecz należy traktować je wyłącznie jako przypadki graniczne. Stan równowagi pomiędzy nimi oraz obecność ewentualnych form przejściowych determinują obserwowane własności wodnych roztworów kwasów [5, 13–28].



Rysunek 5. Model struktury sfer hydratacyjnych (oznaczonych cyframi rzymskimi) zdeformowanego kationu Zundela otrzymany na podstawie widm oscylacyjnych HDO oraz obliczeń *ab initio* [27]. Średnie położenia analitycznych pasm składowych w widmie HDO [cm^{-1}] pokazane dla porównania pod odpowiadającymi im oscylatorami OD

Niedawno zaproponowaliśmy model zdeformowanego kompleksu Zundela na podstawie widm oscylacyjnych HDO w H_2O oraz obliczeń *ab initio* [27]. Charakterystykę strukturalną otoczenia protonu (w tym dalszych sfer hydratacyjnych) przedstawia Rys. 5. Warto podkreślić, że model ten jest co najmniej niesprzeczny z nowymi danymi uzyskanymi dzięki szerokokątnej dyfrakcji promieni rentgenowskich w roztworze wodnym [80]. Bardzo podobny obraz bliskich sfer hydratacyjnych protonu wynika także z niektórych symulacji dynamicznych metodami MC i MD [26, 28].

Hydratacja protonu z pewnością będzie jeszcze wiele lat ważną poznawczo tematyką badawczą, zwłaszcza w zastosowaniach biochemicznych i technologicznych [4, 79]. Rozmaitość metod ekperymentalnych i teoretycznych stosowanych do jej poznania, w tym najnowocześniejszych technik badawczych [22, 24, 25, 77], przyczynia się także do wzrostu ogólnej wiedzy chemicznej.

PODZIĘKOWANIE

Praca finansowana ze środków państwowych na naukę w latach 2005–2006, jako projekt badawczy w ramach grantu nr 3 T09A 152 29. Artykuł powstał w oparciu o wykład wygłoszony na XLIX Zjeździe PTCh i SITPChem w Gdańsku we wrześniu 2006 r. [81].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] R.P. Bell, *The Proton in Chemistry*, Cornell University Press, New York, 1959.
[2] A. Hulanicki, *Reakcje kwasów i zasad w chemii analitycznej*, Wyd. 3, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1992.
[3] R.P. Bell, *Acid-Base Catalysis*, Clarendon Press, Oxford, 1941.
[4] P. Ädelroth, Biochim. Biophys. Acta, 2006, **1757**, 867.
[5] (a) M.E. Tuckerman, K. Laasonen, M. Sprik, M. Parrinello, J. Phys. Chem., 1995, **99**, 5749; (b) D. Marx, M.E. Tuckerman, J. Hutter, M. Parrinello, Nature, 1999, **397**, 601.
[6] P.A. Giguere, J. Chem. Edu., 1979, **56**, 571.
[7] (a) N. Agmon, Chem. Phys. Lett., 1995, **244**, 456; (b) S. Cukierman, Biochim. Biophys. Acta, 2006, **1757**, 876.
[8] C.J.T. de Grotthuss, Ann. Chim., 1806, **58**, 54; Biochim. Biophys. Acta, 2006, **1757**, 871.
[9] M.E. Tuckerman, D. Marx, M.L. Klein, M. Parrinello, Science, 1997, **275**, 817.
[10] (a) E. Wicke, M. Eigen, T. Ackermann, Z. Phys. Chem. (N.F.), 1954, **1**, 340; (b) M. Eigen, L.D. Maeyer, Proc. R. Soc. London, 1958, **247**, 505; (c) M. Eigen, Angew. Chem. Int. Ed., 1964, **3**, 1.
[11] (a) G. Zundel, H. Metzger, Z. Phys. Chem. (N.F.), 1968, **58**, 225; (b) G. Zundel, *Hydration and Intermolecular Interaction*, Academic Press, New York, 1969; (c) G. Zundel, [w:] *The Hydrogen Bond – Recent Developments in Theory and Experiments*, Vol. 2, red. P. Schuster, G. Zundel, C. Sandorfy, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1976, 683.
[12] (a) P.A. Giguere, Chem. Phys., 1981, **60**, 421; (b) N.B. Librovich, V.P. Sakun, N.D. Sokolov, Chem. Phys., 1981, **60**, 425.
[13] Y. Kim, Y. Kim, Chem. Phys. Lett., 2002, **362**, 419.
[14] A. Khan, Chem. Phys. Lett., 2000, **319**, 440.
[15] P. Intharathep, A. Tongraar, K. Sagarik, J. Comput. Chem., 2006, **27**, 1723.
[16] J.M. Heuft, E.J. Meijer, Phys. Chem. Chem. Phys., 2006, **8**, 3116.
[17] D. Wei, D.R. Salahub, J. Chem. Phys., 1997, **106**, 6086.
[18] H.-P. Cheng, J. Phys. Chem. A, 1998, **102**, 6201.
[19] (a) G.A. Voth, Acc. Chem. Res., 2006, **39**, 143; (b) U.W. Schmitt, G.A. Voth, J. Chem. Phys., 1999, **111**, 9361.
[20] R. Vuilleumier, D. Borgis, Chem. Phys. Lett., 1998, **284**, 71; J. Chem. Phys., 1999, **111**, 4251.
[21] J.-C. Jiang, Y.-S. Wang, H.-C. Chang, S. H. Lin, Y. T. Lee, G. Niedner-Schatteburg, H.-C. Chang, J. Am. Chem. Soc., 2000, **122**, 1398.
[22] J.M. Headrick, E.G. Diken, R.S. Walters, N.I. Hammer, R.A. Christie, J. Cui, E.M. Myshakin, M.A. Duncan, M.A. Johnson, K.D. Jordan, Science, 2005, **308**, 1765.
[23] J. Kim, U.W. Schmitt, J.A. Gruetzmacher, G.A. Voth, N.E. Scherer, J. Chem. Phys., 2002, **116**, 737.
[24] S. Woutersen, H.J. Bakker, Phys. Rev. Lett., 2006, **96**, art. nr 138305.

[25] (a) C.D. Cappa, J.D. Smith, B.M. Messer, R.C. Cohen, R.J. Saykally, J. Phys. Chem. B, 2006, **110**, 1166; (b) M. Cavalleri, L.-A. Näslund, D.C. Edwards, P. Wernet, H. Ogasawara, S. Myneni, L. Ojamäe, M. Odelius, A. Nilsson, L.G.M. Pettersson, J. Chem. Phys., 2006, **124**, art. nr 194508.
[26] D. Asthagiri, L.R. Pratt, J.D. Kress, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2005, **102**, 6704.
[27] M. Śmiechowski, J. Stangret, J. Chem. Phys., 2006, **125**, art. nr 204508.
[28] A. Botti, F. Bruni, M.A. Ricci, A.K. Soper, J. Chem. Phys., 2006, **124**, art. nr 014508.
[29] M.D. Newton, S. Ehrenson, J. Am. Chem. Soc., 1971, **93**, 4971.
[30] Y. Xie, R.B. Remington, H.F. Schaefer III, J. Chem. Phys., 1994, **101**, 4878.
[31] A.T. Pudzianowski, J. Chem. Phys., 1995, **102**, 8029.
[32] F.C. Pickard IV, E.K. Pokon, M.D. Liptak, G.C. Shields, J. Chem. Phys., 2005, **122**, art. nr 024302.
[33] I. Tunon, E. Silla, J. Bertran, J. Phys. Chem., 1993, **97**, 5547.
[34] S. Sadhukhan, D. Munoz, C. Adamo, G.E. Scuseria, Chem. Phys. Lett., 1999, **306**, 83.
[35] D. Wei, D.R. Salahub, J. Chem. Phys., 1994, **101**, 7633.
[36] A.T. Pudzianowski, J. Phys. Chem., 1996, **100**, 4781.
[37] G. Corongiu, R. Kelterbaum, E. Kochanski, J. Phys. Chem., 1995, **99**, 8038.
[38] M.C. Vicens, G.E. Lopez, J. Comput. Chem., 2000, **21**, 63.
[39] R. Kelterbaum, E. Kochanski, J. Phys. Chem., 1995, **99**, 12493.
[40] R. Iftimie, M.E. Tuckerman, Angew. Chem. Int. Ed., 2006, **45**, 1144.
[41] M.C.R. Symons, J. Am. Chem. Soc., 1980, **102**, 3982.
[42] M. Śmiechowski, J. Stangret, wyniki nieopublikowane.
[43] T. Ackermann, Z. Phys. Chem. (N. F.), 1961, **27**, 253.
[44] (a) G. Zundel, G.-M. Schwab, J. Phys. Chem., 1963, **67**, 771; (b) I. Kampschulte-Scheuing, G. Zundel, J. Phys. Chem., 1970, **74**, 2363; (c) D. Schiöberg, G. Zundel, Can. J. Chem., 1976, **58**, 2193; (d) M. Leuchs, G. Zundel, J. Phys. Chem., 1978, **82**, 1632; Can. J. Chem., 1980, **58**, 311.
[45] R. Janoschek, E.G. Weidemann, H. Pfeiffer, G. Zundel, J. Am. Chem. Soc., 1972, **94**, 2387.
[46] N.B. Librovich, V.P. Sakun, N.D. Sokolov, Chem. Phys., 1979, **39**, 351.
[47] J.-J. Max, C. Chapados, Appl. Spectrosc., 1998, **52**, 963; Can. J. Chem., 2000, **78**, 64.
[48] (a) J.-J. Max, C. Ménichelli, C. Chapados, J. Phys. Chem. A, 2000, **104**, 2845; (b) C. Ménichelli, J.-J. Max, C. Chapados, Can. J. Chem., 2000, **78**, 1128.
[49] P. Rhine, D. Williams, G.M. Hale, M.R. Querry, J. Phys. Chem., 1974, **78**, 1405.
[50] K. Zawada, P. Dryjański, J. Mol. Struct., 2001, **560**, 283.
[51] W.R. Busing, D.F. Hornig, J. Phys. Chem., 1961, **65**, 284.
[52] P.A. Giguere, J.G. Guillot, J. Phys. Chem., 1982, **86**, 3231.
[53] C.I. Ratcliffe, D.E. Irish, Can. J. Chem., 1984, **62**, 1134.
[54] (a) G. Ritzhaupt, J.P. Devlin, J. Phys. Chem., 1991, **95**, 90; (b) K.L. Nash, K.J. Sully, A.B. Horn, J. Phys. Chem. A, 2001, **105**, 9422.
[55] H.J. Bakker, H.-K. Nienhuys, Science, 2002, **297**, 587.
[56] E.G. Diken, J.M. Headrick, J.R. Roscioli, J.C. Bopp, M.A. Johnson, A.B. McCoy, J. Phys. Chem. A, 2005, **109**, 1487.
[57] Y. Marechal, A. Witkowski, J. Chem. Phys., 1968, **48**, 3697.
[58] A. Witkowski, J. Chem. Phys., 1967, **47**, 3645.
[59] D. Chamma, O. Henri-Rousseau, Chem. Phys., 1998, **229**, 37, 51.
[60] R.C. Taylor, G.L. Vidale, J. Am. Chem. Soc., 1956, **78**, 5999.
[61] M. Śmiechowski, E. Gojło, J. Stangret, J. Phys. Chem. B, 2004, **108**, 15938.
[62] F.S. Lee, G.B. Carpenter, J. Phys. Chem., 1959, **63**, 279.
[63] J.-O. Lundgren, I. Olovsson, [w:] *The Hydrogen Bond - Recent Developments in Theory and Experiments*, Vol. 2, red. P. Schuster, G. Zundel, C. Sandorfy, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1976, 495.

[64] (a) I. Olovsson, J. Chem. Phys., 1968, **49**, 1063; (b) J.-O. Lundgren, I. Olovsson, Acta Cryst., 1967, **23**, 966, 971.
[65] R. Attig, J.M. Williams, Angew. Chem., 1976, **88**, 507.
[66] (a) J.-O. Lundgren, I. Olovsson, J. Chem. Phys., 1968, **49**, 1068; (b) T. Gustafsson, Acta Cryst., 1987, **C43**, 816; (c) A. Flemström, T.K. Hirsch, L. Sehlstedt, S. Lidin, L. Ojamäe, Solid State Sci., 2002, **4**, 1017; (d) Z. Xie, R. Bau, C.A. Reed, Inorg. Chem., 1995, **34**, 5403; (e) B. Krebs, S. Bonmann , K. Erpenstein, Z. Naturforsch., 1991, **46B**, 919; (f) B. Krebs, S. Bonmann, K. Gretenkord, Z. Naturforsch., 1992, **47B**, 93; (g) A. Merschenz-Quack, D. Mootz, Acta Cryst., 1990, **C46**, 1478.
[67] T. Gustafsson, Acta Cryst., 1988, **C44**, 229.
[68] D. Steinborn, O. Gravenhorst, H. Hartung, U. Baumeister, Inorg. Chem., 1997, **36**, 2195.
[69] T. Head-Gordon, G. Hura, Chem. Rev., 2002, **102**, 2651.
[70] R. Triolo, A.H. Narten, J. Chem. Phys., 1975, **63**, 3624.
[71] H.-G. Lee, Y. Matsumoto, T. Yamaguchi, H. Ohtaki, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1983, **56**, 443.
[72] Y. Kameda, T. Usuki, O. Uemura, Israel J. Chem., 1999, **39**, 283.
[73] S.C. Lee, R. Kaplow, Science, 1970, **169**, 477.
[74] D.L. Wertz, J. Solution Chem., 1972, **1**, 489.
[75] (a) R. Caminiti, Chem. Phys. Lett., 1983, **96**, 390; (b) R. Caminiti, P. Cucca, Chem. Phys. Lett., 1984, **108**, 51.
[76] N. Ohtomo, K. Arakawa, M. Takeuchi, T. Yamaguchi, H. Ohtaki, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1981, **54**, 1314.
[77] A. Botti, F. Bruni, S. Imberti, M.A. Ricci, A.K. Soper, J. Chem. Phys., 2004, **121**, 7840.
[78] P. Wernet, D. Nordlund, U. Bergmann, M. Cavalleri, M. Odelius, H. Ogasawara, L.-A. Näslund, T.K. Hirsch, L. Ojamäe, P. Glatzel, L.G.M. Pettersson, A. Nilsson, Science, 2004, **304**, 995.
[79] K.-D. Kreuer, Chem. Mater., 1996, **8**, 610.
[80] M. Śmiechowski, I. Persson, wyniki nieopublikowane.
[81] M. Śmiechowski, J. Stangret, *Materiały zjazdowe XLIX Zjazdu PTCh i SITPChem*, Gdańsk, 2006, 132, S5-W3.

Praca wpłynęła do Redakcji 28 grudnia 2006

WIADOMOŚCI *chemiczne* 2007, **61**, 1-2
PL ISSN 0043-5104

NOWE WYDAWNICTWA

Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler i Stanley R. Crouch, ***Podstawy chemii analitycznej.*** tom 1, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006. Przekład zbiorowy pod redakcją Adama Hulanickiego oparty na ósmym wydaniu amerykańskim, str. 485, oprawa twarda..

Można by zawołać „nareszcie!".

Na naszym rynku podręczników akademickich ukazał się bodaj najpopularniejszy amerykański podręcznik do chemii analitycznej, świetnie znany licznej rzeszy młodych obywateli USA.

Już na pierwszy rzut oka książka daje się polubić: twarda, lakierowana okładka, niezły papier, przemyślany układ graficzny. A już zespół tłumaczy, z prof. Adamem Hulanickim na czele, to jest naprawdę najlepsza rekomendacja z możliwych.

Bliższe spotkanie nie zmienia tej opinii. Nie potrafiłem znaleźć uchybień czy błędów, choćby drukarskich. Kilka losowo rozwiązanych zadań dało wyniki zgodne z podanymi w rozwiązaniach.

Jest to podręcznik pod każdym względem nowoczesny, o przemyślanym układzie, doskonale dobranych przykładach, ożywiany bądź to wywiadami z prominentnymi chemikami, bądź też przykładami z życia codziennego. Przytoczę tylko kilka, dla zachęty.

Jest tu fragment rozmowy z Richardem N. Zare'm, gdy ów światowej sławy chemik opowiada, jak to jego rodzice nie pozwalali mu zaglądać do książek chemicznych, bo to może prowadzić do nieszczęść. Rozdział o błędnych decyzjach podejmowanych na podstawie testów statystycznych jest zilustrowany zdjęciem z obrad ławy przysięgłych, która usiłuje przekonać do werdyktu jedyną ławniczkę, która do niego przekonana nie jest. Nawet zadanie dotyczące obliczenia błędu oznaczenia może rozbawić, jeśli na zdjęciu zobaczymy biuretę-bubel, gdzie na skali mililitrowej opuszczono jedną liczbę, zaś drugą wygrawerowano dwukrotnie (zad. 14–48). Spójrzmy, jak mówiąc o pojemności buforowej, ilustruje się to zagadnienie problemem kwaśnych deszczów i wiąże się je z liczbą ryb w amerykańskich jeziorach (rozdział 9). Nawet nie-chemika zainteresuje, w jaki sposób działają domowe i policyjne analizatory alkoholu w wydychanym powietrzu (rozdział 7). Takich smakowitych kąsków znajdziemy w podręczniku Skooga więcej, trzeba ich tylko poszukać.

Ważnym narzędziem, z którego powinni korzystać studenci studiujący według tego podręcznika, jest komputer, a dokładniej: program *Excel* – składnik pakietu *Microsoft Office*. Książka zawiera fragmenty będące w istocie poradnikiem jak korzystać z *Excela* (oczywiście w ograniczonym zakresie, tylko na ile to jest potrzebne dla osiągnięcia konkretnych celów). Można się wahać, czy jest to rzeczywiście niezbędne w tego rodzaju publikacji, ale jeżeli podręcznik ma być kompletną pomocą naukową, to takie rozwiązanie ma niewątpliwy sens. Nie można zresztą nie zauważyć, jak dużą wagę autorzy przywiązują do obliczeń, zwłaszcza rachunku błędów, najczęściej zbyt zawiłych, aby można je było szybko i bezbłędnie przeprowadzić za pomocą kalkulatora.

Do książki dołączono płytę CD z bardzo licznymi symulacjami i ilustracjami różnych zagadnień, ale też z wieloma danymi; np. znajdziemy tam układ okresowy z informacjami o poszczególnych pierwiastkach. Symulacje polegają głównie na wykonaniu prostego obliczenia wg podanego schematu, więc są raczej czymś w rodzaju sprawdzianu. Trudno jednak powiedzieć, na ile taka pomoc będzie przydatna polskim studentom. Zawartość płyty jest wyłącznie w języku angielskim, zaś jej graficzna atrakcyjność jest nie najwyższa (wiem, że nie o to tutaj chodzi, aliści współczesny student przywykł już do bardziej wyrafinowanych efektów komputerowych). Płyta może natomiast bardzo przydać się przygotowującym zajęcia, choćby ze względu na zawarte w niej dane tabelaryczne.

Autorzy nieustannie zachęcają czytelnika do korzystania z niezmierzonych zasobów internetowych. Kiedy np. mowa o wyrażeniu opisującym stałą równowagi reakcji, odsyłają czytelnika do strony WWW, na której znajduje się angielskie tłumaczenie artykułu z 1864 roku o prawie działania mas, autorstwa jego odkrywców, Guldberga i Waage. Przede wszystkim jednak powołują się głównie na własne zasoby zawierające mnóstwo zadań, danych, tabel, ilustracji, omówień i innych materiałów pomocnych tak studentom w nauce, jak nauczycielom akademickim w przygotowaniu zajęć z chemii analitycznej.

Jest właściwie tylko jedna rzecz, która mi się w tym podręczniku niespecjalnie podoba. Tom pierwszy omawia m.in. zagadnienia z działów ogólnie zaliczanych do reakcji kwas-zasada, równowagi opisywane iloczynem rozpuszczalności oraz równowagi tworzenia kompleksów, natomiast cały dział związany z równowagami przeniesienia elektronów oraz miareczkowaniami redoksometrycznymi znalazł się w tomie drugim, wraz z instrumentalnymi metodami elektrochemicznymi, w którym oprócz tego znajdują się też rozdziały omawiające analityczne metody spektroskopowe i kinetyczne. Uważam, że bardziej logiczne byłoby pozostawienie w drugim tomie wyłącznie metod instrumentalnych i przeniesienie rozdziału o równowagach i klasycznych oznaczeniach redox do pierwszego tomu. Takiej zmiany jednak, co oczywiste, mogliby dokonać tylko autorzy książki.

Reasumując: znanym, lubianym i cenionym polskim podręcznikom J. Minczewskiego i Z. Marczenki, T. Lipca i Z.S. Szmala, A. Cygańskiego i innym przybył potężny konkurent, bardziej nowoczesny, szerzej i atrakcyjniej traktujący o szeroko pojętej chemii analitycznej, wykorzystujący programy komputerowe, głęboko sięgający do zasobów sieci internetowej, z mnóstwem przykładowych zadań oraz dygresji, poszerzających wiedzę i zainteresowanie przedmiotem. A że konkurencja wychodzi zazwyczaj na zdrowie klientom i użytkownikom, z nieukrywanym zadowoleniem witam pierwszego „Skooga" na naszym rynku podręczników chemicznych.

Jacek Gliński

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 1-2
PL ISSN 0043-5104

INFORMACJE

INFORMACJA REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH"

Redakcja „Wiadomości Chemicznych" w porozumieniu z Radą Redakcyjną kontynuuje inicjatywę podjętą na konferencji Dziekanów Wydziałów Chemicznych, która odbyła się w lutym 2007 roku w Poznaniu.

Zgodnie z tą inicjatywą poszczególne ośrodki chemiczne (przede wszystkim uczelniane) w Polsce mogą publikować w „Wiadomościach Chemicznych" informacje o swojej działalności.

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
w Lublinie
Wydział Chemii

zaprasza na studia na kierunkach:

1. CHEMIA

5-letnie magisterskie studia stacjonarne
o specjalności:

• **Chemia podstawowa i stosowana** •

• **Chemia środków bioaktywnych i kosmetyków** •

3-letnie studia stacjonarne I stopnia:

• **Chemia informatyczna** •

2-letnie studia stacjonarne II stopnia (uzupełniające magisterskie)

• **Analityka chemiczna** •

dwustopniowe studia stacjonarne 3+2 lata
od roku akademickiego 2007/2008

5-letnie studia zaoczne o specjalności:

• **Chemia środków bioaktywnych i kosmetyków** •

2. OCHRONA ŚRODOWISKA

międzywydziałowe dwustopniowe studia stacjonarne 3+2 lata

www.umcs.lublin.pl
http://chemia.umcs.lublin.pl/

WYDZIAŁ CHEMII UNIWERSYTETU WROCŁAWSKIEGO
zaprasza na bezpłatne kursy:

NOWOCZESNY PRACOWNIK LABORATORIUM

Szkolenie jest finansowane ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego (75%) oraz budżetu państwa (25%), realizowane pod nadzorem Dolnośląskiego Wojewódzkiego Urzędu Pracy w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego w punkcie:

Priorytet 2 Wzmocnienie rozwoju zasobów ludzkich w regionach
Działanie 2.1. Rozwój umiejętności powiązany z potrzebami regionalnego rynku pracy i możliwości kształcenia ustawicznego w regionie.

Celem szkoleń jest aktualizacja wiedzy w zakresie nowoczesnych metod analitycznych, przygotowanie metody pomiarowej do walidacji, projektowanie systemów bezpieczeństwa w laboratorium chemicznym.
Program szkoleń obejmuje 52 godziny zajęć w formie wykładów, warsztatów i laboratoriów.
Podczas szkoleń istnieje możliwość uzyskania certyfikatów biegłości analitycznej.

Uniwersytet Wrocławski
Wydział Chemii
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław

Dodatkowe informacje znajdują się na stronie internetowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego www.chem.uni.wroc.pl/METFIZ/kursy/index.html oraz pod numerem telefonu 071/37 57 210

AKADEMIA EKONOMICZNA
im. Oskara Langego we Wrocławiu

Oferta edukacyjna
Wydziału Inżynieryjno-Ekonomicznego

Od 50 lat Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny prowadzi kształcenie o charakterze interdyscyplinarnym, łącząc nowoczesną wiedzę i umiejętności inżynierskie z wiedzą ekonomiczną i menedżerską.

Kształcenie jest prowadzone na kierunku o nazwie **zarządzanie i inżynieria produkcji**, w ramach następujących specjalności:

- **zarządzanie i inżynieria produkcji żywności,**
- **zarządzanie i inżynieria w przemyśle chemicznym,**
- **zarządzanie i inżynieria ochrony środowiska.**

Przewiduje się uruchomienie w roku akademickim 2006/2007 kolejnej specjalności – **zarządzanie procesami biotechnologicznymi**.

Proces dydaktyczny jest realizowany w ramach studiów **stacjonarnych** (we Wrocławiu) i **niestacjonarnych** (we Wrocławiu i w zamiejscowych ośrodkach dydaktycznych w Kłodzku, Oleśnie, Przygodzicach i Żłobiźnie).

Wybór specjalności następuje w czwartym semestrze studiów. W trakcie nauki studenci mają zajęcia z ogólnych przedmiotów ekonomicznych (zarządzanie strategiczne, zarządzanie produkcją i usługami, zarządzanie jakością (TQM), marketing, badania operacyjne i logistyka, controlling, rachunkowość, ekonomika i organizacja przedsiębiorstwa, zarządzanie finansami) oraz ogólnotechnicznych (fizyka, chemia, wprowadzenie do techniki, podstawy metrologii, materiałoznawstwo, ekologia i ochrona środowiska, podstawy projektowania inżynierskiego).

W programie studiów relacja między przedmiotami ekonomicznymi i technicznymi wynosi około 1:1.

Na IV roku studiów studenci dokonują wyboru odpowiadającego im tematycznie seminarium magisterskiego, które kończy się egzaminem magisterskim.

W ofercie edukacyjnej Wydziału są także niestacjonarne, 1,5-roczne uzupełniające studia magisterskie dla studentów z tytułem zawodowym inżyniera uzyskanym w uczelni akademickiej lub zawodowej, otrzymanym na kierunku – tym samym lub pokrewnym do kierunku realizowanego na Wydziale Inżynieryjno-Ekonomicznym (oceny stopnia pokrewieństwa kierunku dokonuje dziekan Wydziału).

Informacje o Wydziale
Akademia Ekonomiczna im. Oskara Langego we Wrocławiu
Dziekanat Wydziału Inżynieryjno-Ekonomicznego
53-345 Wrocław, ul. Komandorska 118/120
Studia stacjonarne
Bud. A, pok. 127, tel.: (71) 36-80-148 fax.: (71) 36-80-627
Studia niestacjonarne
Bud. A. pok. 129, tel.: (71) 36-80- 149

Serdecznie zapraszamy na studia do Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu na elitarny Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny.

UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU
Wydział Biologiczno-Chemiczny
INSTYTUT CHEMII

15-399 Białystok, ul. Hurtowa 1,
tel/fax: (085) 7470113, 7457800; e-mail: chemia@uwb.edu.pl

Instytut Chemii Uniwersytetu w Białymstoku, wspólnie z Instytutem Biologii, wchodzi w skład Wydziału Biologiczno-Chemicznego. W 2005 roku mury Instytutu już po raz dwudziesty ósmy opuścili absolwenci. Do 1997 roku Białostocka Uczelnia funkcjonowała jako Filia Uniwersytetu Warszawskiego.

Przez wiele lat Instytut borykał się z kłopotami lokalowymi. Wiosną 2002 roku przekazany został w użytkowanie nowy budynek. Instytut w dalszym ciągu funkcjonuje w dwóch budynkach, są jednak realne szanse na rozbudowę nowego budynku w ten sposób, by cały Instytut mieścił się w jednym kompleksie.

Kadra samodzielnych pracowników naukowych Instytutu nie jest liczna – obecnie jest to dwanaście osób z tytułem profesora lub stopniem doktora habilitowanego. Chociaż w najbliższym czasie kilkoro naszych pracowników przystąpi do kolokwium habilitacyjnego, to jednak chcemy powiększyć kadrę o kilka osób, dotychczas niezwiązanych z naszym Instytutem.

Zwracamy się zatem z propozycją podjęcia pracy w naszym Instytucie przez profesorów i doktorów habilitowanych z innych ośrodków naukowych w Polsce. Nie wykluczamy również podjęcia rozmów o zatrudnieniu z doktorami, którzy po niedługim czasie uzyskają stopień doktora habilitowanego. Liczymy na osoby, które w niedalekiej przyszłości zdecydują się na zamieszkanie w Białymstoku i rozwinięcie tu swojego warsztatu badawczego. Oferujemy nie tylko dobre warunki pracy ale i pomoc w załatwieniu spraw mieszkaniowych. Inne walory województwa podlaskiego są powszechnie znane: czyste powietrze, bliskość wspaniałych lasów i jezior, życzliwi ludzie i dobre połączenia komunikacyjne z innymi regionami Polski.

Kontakt z nami można nawiązać między innymi za pośrednictwem poczty elektronicznej:

Krzysztof Winkler: winkler@uwb.edu.pl
Anatol Kojło: kojlo@uwb.edu.pl
oraz: chemia@uwb.edu.pl

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

Nomenklatura steroidów (Zalecenia 1989), tłum. J.W. Morzycki i W.J. Szczepek, cena 3 zł

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł

Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywiduów chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*, cena 8 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręk, cena 20 zł

Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994), red. i tlum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wnosić na konto: BPH SA I O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597.

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne" publikują artykuły referatowe, nie oryginalne prace doświadczalne, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i nie drukowane przedtem w innych czasopismach. Artykuły publikowane w „Wiadomościach Chemicznych" nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach. Treść artykułów powinna odpowiadać stanowi wiedzy w chwili pisania artykułu. Piśmiennictwo cytowane powinno uwzględniać najnowsze prace krajowe i zagraniczne z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopisy (wydruki komputerowe) należy nadsyłać Redakcji w **dwóch egzemplarzach**: oryginał i kopia lub kserokopia pisana jednostronnie, z zachowaniem podwójnej interlinii i marginesu szerokości 5 cm z **prawej** strony; pierwszy wiersz akapitu należy zaznaczyć wcięciem na 5 uderzeń w klawisz.

Na pierwszej stronie pod tytułem polskim należy umieścić tytuł w języku angielskim, adres autora oraz spis rozdziałów. Praca powinna zawierać obszerne streszczenie w języku angielskim (do 1,5 strony maszynopisu z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście). Na osobnej kartce prosimy o krótką (do 150 wyrazów) notkę z informacją o uprawianej przez Autora tematyce naukowej i przebiegu pracy. Prosimy o podanie tytułu naukowego i miejsca pracy oraz o dołączenie aktualnego zdjęcia. Przysłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać szczegółów, odsyłając czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego. Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron wraz z tabelami i wykazem piśmiennictwa lub 100 stron, jeśli jest monografią przeznaczoną do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych". Artykuły powinny być napisane za pomocą komputera. Redakcja prosi o dołączenie dyskietki z tekstem pracy i ilustracjami wraz z wyczerpującą informacją o używanym edytorze. Pożądany edytor Word (co najmniej wersja 6).

Rysunki (mogą być kolorowe, ale za dopłatą do druku) należy nadsyłać w dwóch egzemplarzach (oryginały i kopie lub kserokopie). Oryginały rysunków muszą mieć taką formę graficzną, by nadawały się do reprodukcji. Na odwrotnej stronie należy podać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku i ten sam numer zaznaczyć w odpowiednim miejscu maszynopisu. Na osobnym arkuszu dołączyć podpisy pod rysunki. **Do pracy należy dołączyć jeden komplet wzorów i schematów narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji**.

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi oraz podać ich tytuły.

Piśmiennictwo zestawia się w kolejności cytowania w tekście: powinno ono zawierać kolejno inicjały imion i nazwisko, skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, tom podkreślony i numer pierwszej strony cytowanej pracy. Wykaz skrótów ważniejszych czasopism chemicznych jest podany w „Wiadomościach Chemicznych", 1989, **43**, 979. Jeśli część piśmiennictwa zebrana jest w monografiach lub innych wydawnictwach, nie należy podawać szczegółowo wykazu tego piśmiennictwa, lecz cytować odnośne wydawnictwo.

O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. **Maszynopisy nie odpowiadające podanym warunkom nie będą przez Komitet rozpatrywane**. Artykuły nie zakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu. Autorzy przeprowadzają jedną korektę tekstu.

Honoraria za wydrukowane prace są wypłacane wyłącznie tym Autorom, których artykuły zostały zamówione przez Redakcję. Autorzy wydrukowanych prac otrzymują bezpłatnie 20 nadbitek.

DO CZYTELNIKÓW „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2007 r. wynosi 120 zł dla instytucji i nie zrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz 60 zł dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank Przemysłowo-Handlowy S.A.
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 53-316 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTCh, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

– prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2007 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi 60 zł (składka – 50 zł, prenumerata – 10 zł);

– emeryci, doktoranci oraz studenci płacą 25 zł (składka – 15 zł, prenumerata – 10 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą 30 zł (składka – 20 zł, prenumerata – 10 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Millennium BIG BG SA, Nr 57 1160 2202 0000 0000 2720 2458

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

WIADOMOŚCI chemiczne 2007, **61**, 1-2
PL ISSN 0043-5104

SPIS TREŚCI

Profesor Piotr Sobota – 65-lecie urodzin 1
Michał KARCHIER, Karol MICHALAK, Jerzy WICHA: Leki przeciw grypie. Synteza Tamiflu® – leku gromadzonego, aby zapobiec epidemii ptasiej grypy 7
Michał CIOŁKOWSKI, Elżbieta BUDZISZ: Kompleksy platyny(IV) jako potencjalne związki przeciwnowotworowe 43
Beata PLITTA, Małgorzata GIEL-PIETRASZUK, Jan BARCISZEWSKI: Metody otrzymywania nienaturalnych aminoacylo-tRNA 61
Justyna SAMASZKO, Agnieszka ŁAKOMIEC, Janusz MADAJ: Budowa i synteza glikopeptydów 79
Maciej ŚMIECHOWSKI, Janusz STANGRET: Hydratacja protonu w roztworze wodnym 99

Nowe wydawnictwa 117

Informacje 119

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

Andrzej MACIEJEWSKI, Gotard BURDZIŃSKI, Krzysztof DOBEK, Anna GRABOWSKA, Jerzy KAROLCZAK, Ewa KRYSTKOWIAK, Jacek KUBICKI, Adam ŁUKASZEWICZ, Ryszard NASKRĘCKI, Marcin ZIÓŁEK: Właściwości spektralne i fotofizyczne wybranych cząsteczek aromatycznych i indywiduów przejściowych w krót kożyjących stanach wzbudzonych

Marek L. GŁÓWKA, Andrzej OLCZAK, Joanna BOJARSKA, Małgorzata SZCZESIO: Strukturalne zagadki kompleksowanych gramicydyn w ich kryształach

Stanisław CUDZIŁO, Wojciech KICIŃSKI: Nanostrukturalne materiały wtbuchowe – otrzymywanie i właściwości

Agnieszka ŁAKOMIEC, Justyna SAMASZKO, Janusz MADAJ: Wankomycyna i jej chemiczne modyfikacje

Hanna MAZUR-MARZEC, Anna TORUŃSKA: Nodularyny i inne toksyny produkowane przez cyjanobakterie (sinice)

Krzysztof STANINSKI, Stefan LIS: Elektrogenerowana chemiluminescencja kompleksów lantanowców(III) na elektrodzie Al/Al_2O_3

Nowe wydawnictwa

Informacje