

УДК 542.91:547.466.2:547.241:546.100.0:2.3:547.15/17

## СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ФОСФИНОВОГО ПСЕВДОПРОЛИЛГЛИЦИЛПРОЛИНА

© 2021 г. К. В. Шевченко<sup>1,\*</sup>, М. Э. Дмитриев<sup>2</sup>, А. В. Винюков<sup>2</sup>, В. П. Шевченко<sup>1</sup>, И. П. Калашникова<sup>2</sup>, И. Ю. Нагаев<sup>1</sup>, В. В. Рагулин<sup>2</sup>, академик РАН Н. Ф. Мясоедов<sup>1</sup>

Поступило 07.11.2020 г.

После доработки 24.12.2020 г.

Принято к публикации 31.12.2020 г.

Проведен синтез рацемического фосфинового трипептида **1** пирролидин-2-ил-{3-[(2-гидроксикарбонил)-пирролидин-1-ил]-3-оксо-пропил}-фосфиновой кислоты, показана его высокая устойчивость к действию лейцинаминопептидазы, карбоксипептидазы  $\Upsilon$  и ферментной системы мембран мозга крыс. В экспериментах *in vitro* с использованием синтетического пептида Семакс было обнаружено, что в случае лейцинаминопептидазы и карбоксипептидазы  $\Upsilon$  влияние полученного трипептида **1** на скорость гидролиза Семакса минимально. В экспериментах с использованием ферментной системы мембран мозга крыс уменьшение скорости гидролиза Семакса было более очевидным.

**Ключевые слова:** фосфиновые производные, пептиды, протеолиз, синтез, Семакс

**DOI:** 10.31857/S2686953521010106

Известно, что основным механизмом контроля в биологических системах является ингибирование ферментативной активности. Многие лекарства и токсические агенты действуют путем ингибирования ферментов. Ингибирование также может быть источником понимания механизма действия фермента. Фосфиновые псевдопептиды представляют собой очень удобные модели для изучения ингибирования различных ферментов, в основном металлопротеиназ [1–4]. Замена природного остатка [C(O)NH] негидролизующим метилфосфорильным фрагментом [P(O)(OH)CH<sub>2</sub>] позволяет влиять на эффективность пептидного гидролиза [3, 4]. Одним из перспективных объектов структурной модификации является семейство коротких пролинсодержащих пептидов – глипролинов, фрагментов коллагена, состоящих из аминокислот пролина и глицина (ProGly, Gly-Pro, ProGlyPro), проявляющих фибринолитические, антитромботические свойства, а также обладающих противоязвенной активностью [5–7].

Цель работы – синтез и оценка стабильности фосфинового псевдопролилглицилпролина **1**, а также влияния этого соединения на активность протеаз. В качестве репера использовался Семакс (синтетический пептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro).

Существует несколько подходов к синтезу фосфиновых пролинсодержащих псевдо-дипептидов. Например, построение аминоксифосфорильной функции в молекуле фосфиновых псевдо-дипептидов возможно взаимодействием гидрофосфорильного соединения со второй компонентой синтеза, совмещающей amino- и карбонильную функции в одной молекуле алкилиденбискарбамата [8, 9] или  $\omega$ -амидоальдегида [10]. Ранее был разработан синтез N-бензилоксикарбонил-пирролидин-2-ил-2'-(этилоксикарбонил)этилфосфиновой кислоты **2** с использованием 4-(бензилоксикарбонил)бутиральдегида **3** взаимодействием со структурным изостером 2-(этилоксикарбонил)-этилфосфонистой кислотой **4** в растворе уксусного альдегида [10].

В данной работе предложен более эффективный синтез соединения **2** (схема 1), который предполагает на первом этапе использование альдегидной компоненты и защищенных аминоксилфосфонистых кислот [11].

К раствору 1.2 экв. соединения **4** в хлористом ацетиле при температуре 0–5°C по каплям добавляли раствор 1 экв. соединения **3** в сухом толуоле. Образовавшуюся смесь продолжали перемешивать при 0–5°C в течение 2 ч, затем при комнат-

<sup>1</sup> Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (НИЦ “Курчатовский институт” – ИМГ), 123182 Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт физиологически активных соединений Российской академии наук (ИФАВ РАН), 142432 Черноголовка, Московская область, Россия

\*E-mail: ATCarma@mail.ru

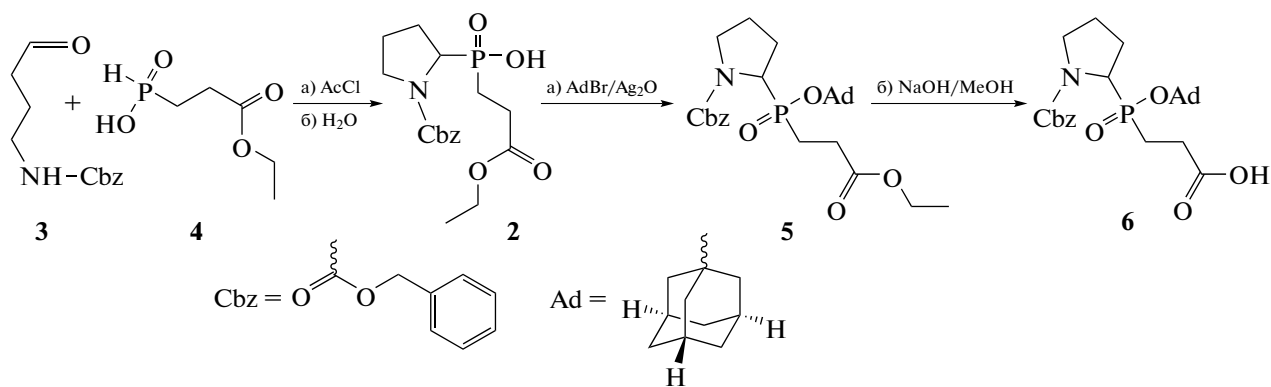


Схема 1. Синтез адамантилового эфира N-бензилоксикарбонил-пирролидин-2-ил-2'-(гидроксикарбонил)этилфосфиновой кислоты **6** (предшественника фосфинового трипептида **1**).

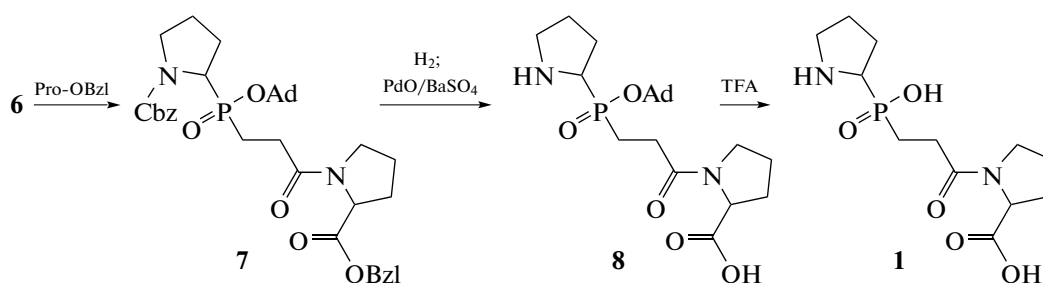


Схема 2. Синтез фосфинового трипептида **1**.

ной температуре в течение ~5 ч. За ходом реакции наблюдали с помощью  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии. Затем реакционную смесь упаривали. Остаток обрабатывали водой со льдом и экстрагировали хлороформом. Органический экстракт промывали водой, сушили над сульфатом магния и удаляли растворитель. Маслообразный остаток, согласно спектральным данным [11], представлял собой соединение **2**, которое использовали в дальнейшем превращения без дополнительной очистки. Выход соединения **2** достигал 83%.

Синтез адамантилового эфира N-бензилоксикарбонил-пирролидин-2-ил-2'-(этилоксикарбонил)этилфосфиновой кислоты **5** проводили по методу [12]. Затем снимали защитную группу с карбоксила с целью получения адамантилового эфира N-бензилоксикарбонил-пирролидин-2-ил-2'-(гидроксикарбонил)этилфосфиновой кислоты **6** [10–12]. Дальнейший синтез псевдо-трипептида **1** проводили по схеме 2 [13].

К раствору 1 экв. соединения **6** в хлороформе при перемешивании при комнатной температуре вводили 2 экв. дициклогексилкарбодиимида [13]. Через 15 мин прибавляли раствор 2 экв. солянокислого Pro-OBzl в хлороформе с триэтиламинном ( $\text{Et}_3\text{N}$ ). Перемешивание продолжали еще 14 ч. Выпавшую мочевину отфильтровывали. Хло-

роформ удаляли упариванием, остаток лиофилизировали. Очистку адамантилового эфира N-бензилоксикарбонил-пирролидин-2-ил-3-[(2-бензилоксикарбонил)-пирролидин-1-ил]-3-оксопропил}-фосфиновой кислоты **7** проводили на колонке Reprosil pur C18aq (20 × 150 мм, размер частиц 10 мкм) (Германия), в системе А (30% MeOH + 0.1% AcOH), В (MeOH). Скорость подачи элюента 20 мл мин<sup>-1</sup>. Время удерживания соединения **7** составило 3.60 мин. Выход препарата – 50% ( $[\text{M} + \text{H}] = 663$ ,  $[\text{M} + \text{Na}] = 685$ ).

Бензилоксикарбонильную и бензиловую защиты снимали каталитическим гидрированием этанольного раствора соединения **7** в присутствии 5% PdO/BaSO<sub>4</sub> в течение 3 ч [13]. Анализ проводили на хроматографе Милихром-A02 с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C<sub>18</sub> AQ DB-2003 (2 × 75 мм, размер частиц 5 мкм) (Германия) в градиенте 0.1% CH<sub>3</sub>COOH–метанол за 12.5 мин при температуре 35 С. Скорость подачи элюента 0.2 мл мин<sup>-1</sup>. До гидрирования время удерживания соединения **7**–2.50 мин (линейный градиент В от 80 до 100%). После гидрирования время удерживания адамантилового эфира пирролидин-2-ил-3-[(2-гидроксикарбонил)-пирролидин-1-ил]-3-оксопропил}-фосфиновой кислоты **8** – 4.58 мин (линейный градиент В от 30 до

100%). Хроматографический анализ и масс-спектр соединения **8** показали отсутствие исходного соединения. После снятия бензилоксикарбонильной и бензиловой защит по данным масс-спектрометрии в масс-спектре соединения **8** обнаружены пики с массой 439 ( $[M + H]$ ) и 461 ( $[M + Na]$ ).

Последнюю стадию синтеза (снятие Ad-защиты с соединения **8**) проводили без его предварительной хроматографической очистки обработкой  $CF_3COOH$  в течение 30 мин. Анализ проводили на хроматографе Милихром-А02 (Россия), как описано выше (линейный градиент В от 0 до 100% за 12.5 мин, подача элюента 0.2 мл мин<sup>-1</sup>, время удерживания 4.06 мин). Выход соединения **1** при снятии защитных групп составил 64%. Масс-спектр соединения после снятия Ad-защиты содержал один пик, соответствующий массе 304.87 ( $[M + H]$ ).

Устойчивость рацемического фосфинового трипептида **1** оценивали в присутствии аминоксипептидазы. В качестве репера при исследовании влияния этого соединения на функционирование данных ферментов использовали Семакс. В экспериментах использовали лейцинаминопептидазу (К.Ф. 3.4.11.2, Тип VI, микросомальная из почки свиньи, 9.2 ед. акт. мг<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, США), карбоксипептидазу Y (К.Ф. 3.4.16.1, из хлебопекарных дрожжей, 17 ед. акт. мг<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, США) и микросомальную фракцию мембран мозга крысы (МФМК). Работы *in vitro* проводили по методикам [14, 15].

Ферментативный гидролиз Семакса и трипептида **1** проводили по следующей методике. К раствору 0.185 мкмоль пептида в 280 мкл фосфатно-солевого буфера (27.4 мМ NaCl, 0.4 мМ KCl, 2 мМ Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> в 100 мл H<sub>2</sub>O, pH 7.4) добавляли 0.0184 ед. акт. лейцинаминопептидазы (10 мкмоль ед. акт.<sup>-1</sup>) или 2 ед. акт. карбоксипептидазы Y (0.092 мкмоль ед. акт.<sup>-1</sup>) или 120 мкл МФМК в этом же буфере. Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 20 мкл через определенные промежутки времени. Остановка ферментативного гидролиза осуществлялась добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола. Анализ смеси проводили методом ВЭЖХ. При работе с МФМК перед анализом пробы очищали твердофазной экстракцией на обращенной фазе, суть которой заключалась в нанесении пептидной фракции на патрон, упакованный обращенной фазой Lichrogrep RP-18 (Merck, Германия), с последующим элюированием пептидов метанолом с 0.1% ТФУ. Далее смесь упаривали и растворяли в 200 мкл смеси метанол : вода = 5 : 95.

Установлено, что трипептид **1** при использовании лейцинаминопептидазы, карбоксипептидазы Y и МФМК устойчив к действию этих ферментных систем. Реакции вели в течение 3 сут.

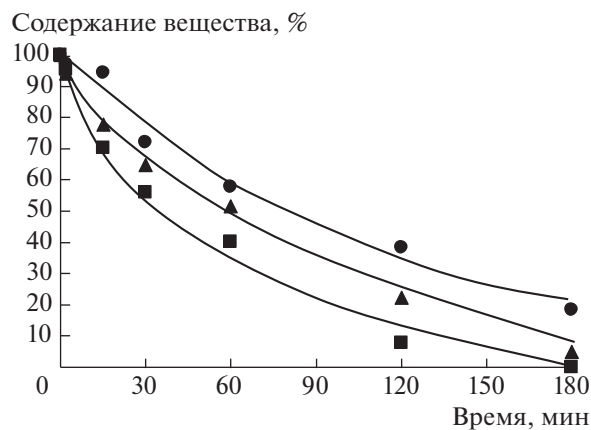


Рис. 1. Протеолиз под действием МФМК Семакса (■) и смеси Семакса и фосфинового трипептида **1** при мольном соотношении 1:1 (▲) и 1:5 (●).

Показано, что даже увеличение концентрации лейцинаминопептидазы в 10 раз или МФМК в 5 раз не сказывалось на изменении содержания трипептида **1** в инкубационной смеси. При проведении экспериментов с участием Семакса установлено, что при использовании лейцинаминопептидазы и карбоксипептидазы Y влияние трипептида **1** на скорость гидролиза Семакса минимально. На определенное влияние трипептида **1** на протеолиз Семакса указывает сохранение небольшого количества Семакса в реакционной смеси при инкубации в течение 3 сут в случае лейцинаминопептидазы на 2.1%, в случае карбоксипептидазы – на 3.2%.

При использовании МФМК изменение скорости гидролиза Семакса в присутствии рацемического трипептида **1** более очевидно (рис. 1). При увеличении концентрации трипептида **1** протеолиз Семакса еще больше замедлялся.

Этот эффект, по-видимому, связан с тем, что в МФМК присутствуют металлозависимые протеиназы [16]. Ингибирование их фосфиновым псевдопролилглицилпролином приводило к частичному замедлению деградации Семакса.

Таким образом, есть основание считать, что синтезированный фосфиновый трипептид **1** может влиять на деградацию пептидов за счет ингибирования металлопротеиназ и, следовательно, имеет перспективы для контроля ферментативной активности в живых организмах.

## ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работу проводили по плановому госзаданию, госрегистрация № АААА-А19-119022590101-1, по теме: “Исследование структуры и функции природных пептидов с целью создания новых лекарственных препаратов, оптимизация структуры кандидатных пептидов, разработка схем синтеза, включая получение меченных дейтерием и тритием физиологически активных соединений”; часть исследований выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ РАН 2019 г. (тема № 0090-2019-0008); синтетическая часть работы поддержана грантами РФФИ (проекты № 18-03-00959 и № 18-03-01123).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Collinsova M., Jiracek J.* // *Current Med. Chem.* 2000. V. 7. № 6. P. 629. <https://doi.org/10.2174/0929867003374831>
2. *Dive V., Georgiadis D., Matziari M., Makaritis A., Beau F., Cuniasso P., Yiotakis A.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. № 16. P. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4050-y>
3. *Mucha A.* // *Molecules.* 2012. V. 17. № 11. P. 13530. <https://doi.org/10.3390/molecules171113530>
4. *Georgiadis D., Dive V.* // *Top Curr. Chem.* 2015. V. 360. P. 1. [https://doi.org/10.1007/128\\_2014\\_571](https://doi.org/10.1007/128_2014_571)
5. *Ashmarin I.P., Samonina G.E., Lyapina L.A., Kamenskii A.A., Levitskaya N.G., Grivennikov I.A., Dolotov O.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F.* // *Pathophysiology.* 2005. V. 11. № 4. P. 179. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2004.10.001>
6. *Медведева Е.В., Дмитриева В.Г., Поварова О.В., Лимборская С.А., Скворцова В.И., Мясоедов Н.Ф., Дергунова Л.В.* // *Молекулярная биология.* 2014. Т. 48. № 2. С. 277. <https://doi.org/10.7868/S0026898414020128>
7. *Ашмарин И.П., Алфеева Л.Ю., Андреева Л.А., Бакаева З.В., Климова П.А., Мясоедов Н.Ф., Павлов Т.С., Самонина Г.Е.* // Патент РФ № 2252779 (27.05.2005) Б. И. 2005. № 15. [https://fips.ru/registers-doc-view/fips\\_servlet?DB=RUPAT&rn=6672&DocNumber=2252779&TypeFile=html](https://fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&rn=6672&DocNumber=2252779&TypeFile=html). Ссылка активна на 12 января 2021.
8. *Dmitriev M.E., Ragulin V.V.* // *Tetrahedron Lett.* 2010. V. 51. № 19. P. 2613. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.03.020>
9. *Dmitriev M.E., Ragulin V.V.* // *Tetrahedron Lett.* 2012. V. 53. № 13. P. 1634. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.01.094>
10. *Винюков А.В., Дмитриев М.Э., Афанасьев А.В., Рагулин В.В., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф.* // *ЖОХ.* 2017. Т. 87. № 2. С. 291.
11. *Винюков А.В.* Одинарное, двойное и циклическое амидоалкилирование гидрофосфорильных соединений / Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. ИФАВ РАН. Черногловка. 2017. 95 с. <https://www.dissercat.com/content/odinarnoe-dvoinoe-i-tsiklichesкое-amidoalkilirovanie-gidrofosforilnykh-soedinenii>. Ссылка активна на 12 января 2021.
12. *Georgiadis D., Dive V., Yiotakis A.* // *J. Org. Chem.* 2001. V. 66. № 20. P. 6604. <https://doi.org/10.1021/jo0156363>
13. *Гершкович А.А., Кибирев В.К.* Химический синтез пептидов. Киев: Наукова Думка, 1992.
14. *Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф.* // *Биоорган. химия.* 2013. Т. 39. № 3. P. 320. <https://doi.org/10.7868/S0132342313030159>
15. *Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф.* // *Хим.-фарм. журнал.* 2015. Т. 49. № 2. С. 12.
16. *Антонов В.К.* Химия протеолиза. М.: Наука, 1991. 504 с.

## SYNTHESIS AND STUDY OF THE PROPERTIES OF PHOSPHINIC PSEUDOPROLYLGLYCYLPROLINE

K. V. Shevchenko<sup>a, #</sup>, M. E. Dmitriev<sup>b</sup>, A. V. Vinyukov<sup>b</sup>, V. P. Shevchenko<sup>a</sup>, I. P. Kalashnikova<sup>b</sup>, I. Yu. Nagaev<sup>a</sup>, V. V. Ragulin<sup>b</sup>, and Academician of the RAS N. F. Myasoedov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Molecular Genetics of National Research Centre “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute” – IMG), 123182 Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Physiologically Active Substances of the Russian Academy of Sciences (IPAC RAS), 142432 Chernogolovka, Moscow region, Russian Federation

<sup>#</sup>E-mail: ATCarma@mail.ru

The synthesis of racemic phosphinic tripeptide **1** pyrrolidin-2-yl-[3-[(2-hydroxycarbonyl)-pyrrolidin-1-yl]-3-oxo-propyl]-phosphinic acid was carried out, its high resistance to the action of leucine aminopeptidase, carboxypeptidase Y and the enzyme system of rat brain membranes was found. In *in vitro* experiments using Semax, it was found that the effect of tripeptide **1** on the rate hydrolysis of Semax, in the case of leucine aminopeptidase and carboxypeptidase Y, is minimal. In experiments using the enzyme system of rat brain membranes, the decrease in the rate of hydrolysis of Semax was more evident.

**Keywords:** phosphine derivatives, peptides, proteolysis, synthesis, Semax