

# ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ТИРОЗИНА И ТРИПЕПТИДА (Tyr-Thr-Lys) ЦИКЛОГЕКСИЛ МЕТИЛ- И (ДЕЙТЕРОМЕТИЛ)ХЛОРФОСФОНАТАМИ

© 2020 г. И. А. Родин<sup>a,\*</sup>, Т. М. Байгильдиев<sup>a</sup>, В. И. Крылов<sup>b</sup>, В. Н. Осипов<sup>c</sup>, И. И. Крылов<sup>b</sup>, В. А. Яшкир<sup>b</sup>, И. В. Рыбальченко<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Ленинские горы 1/3, Москва, 119991 Россия

<sup>b</sup> 27 Научный центр Министерства обороны Российской Федерации, Москва, 105005 Россия

<sup>c</sup> ЗАО «Фарм-Синтез», Москва, 111024 Россия

\*e-mail: igorrodin@yandex.ru

Поступило в Редакцию 13 ноября 2019 г.

После доработки 2 декабря 2019 г.

Принято к печати 12 декабря 2019 г.

Разработаны способы фосфорилирования тирозина и трипептида Tyr-Thr-Lys циклогексилметил(дейтерометил)хлорфосфонатами. Фосфорилированные продукты предназначены для использования в качестве образцов сравнения при анализе плазмы крови пациентов, предположительно подвергшихся экспонированию циклогексилметилфторфосфонатом (циклозарин). Определены и оптимизированы условия хроматографического разделения и очистки полупродуктов синтеза, что позволило получить на конечном этапе синтеза фосфорилированные продукты высокой степени чистоты.

**Ключевые слова:** биомаркер, трипептид, фосфорилирование

**DOI:** 10.31857/S0044460X20040101

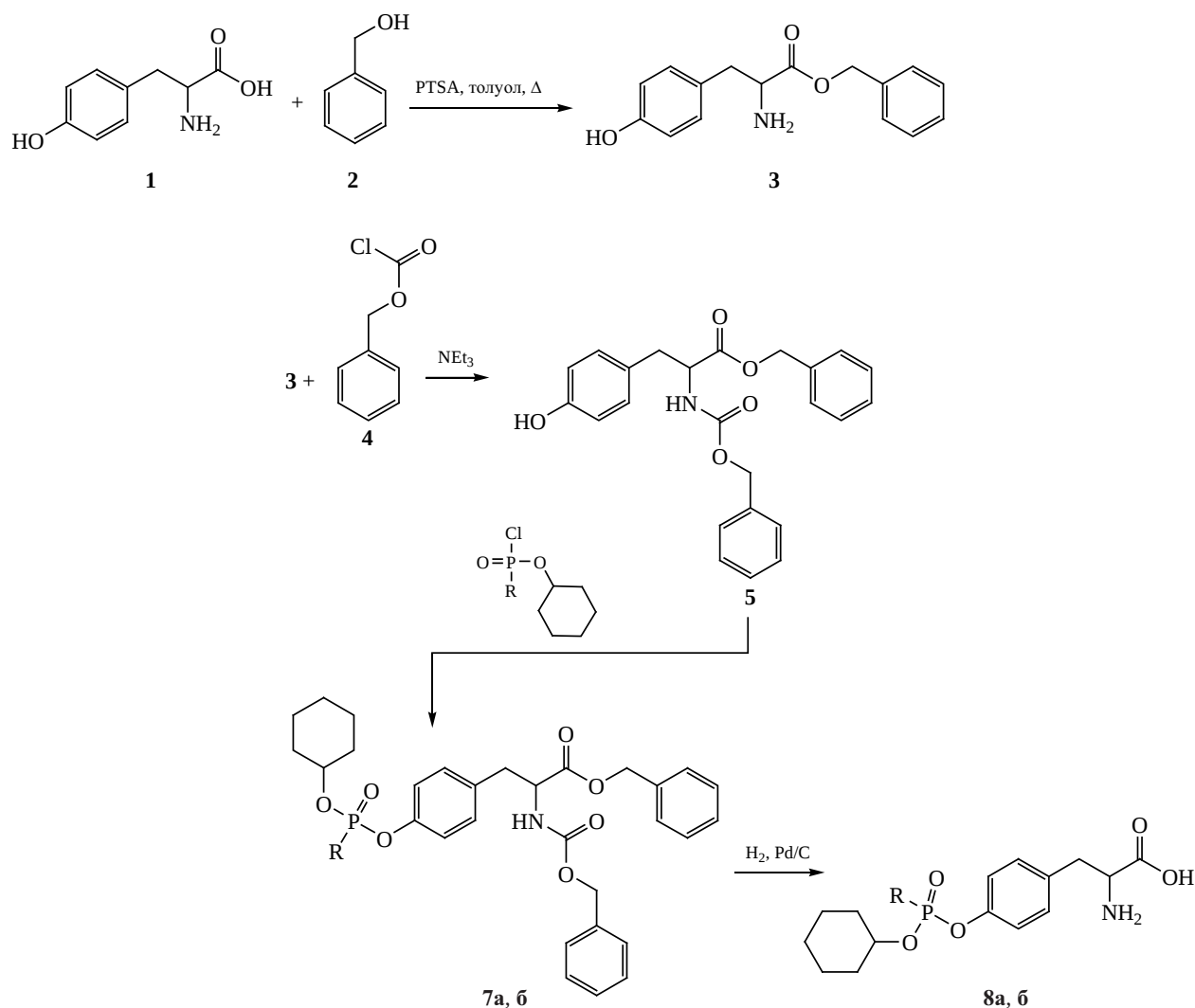
Циклогексилметилфторфосфонат (циклозарин) входит в число алкил(алкил)фторфосфонатов, включенных в 1 Список Приложения по химикатам Конвенции о запрещении химического оружия [1] и подлежащих полному запрету в отношении их разработки, производства, накопления и применения. Согласно инструкции по анализу биомедицинских проб [2], Организацией по запрещению химического оружия (ОЗХО) предписано осуществлять выявление в биомедицинских пробах биомаркеров приоритетных алкил(алкилфтор)-фосфонатов с установлением их точной структуры. В 4 официальном биомедицинском тесте ОЗХО, проведенном в 2019 году, для анализа участвующими в тесте национальными лабораториями были представлены образцы плазмы крови человека, экспонированные циклозарин. Опыт участия в данном и предшествующих биомедицинских тестах ОЗХО однозначно указывает на то, что для достоверной идентификации биомаркеров экспозиции организма алкил(алкилфтор)фосфона-

тами, включая циклозарин, необходимо наличие высокочистых соединений сравнения. К числу последних, согласно литературным данным [3, 4], могут быть отнесены и образующиеся в организме продукты взаимодействия циклозарина с тирозином и трипептидом Tyr-Thr-Lys. Разработка способов синтеза высокочистых образцов сравнения данных соединений, включая дейтерированные аналоги, явилась целью настоящего исследования.

Получение фосфорилированных производных тирозина осуществляли по схеме 1, включающей последовательную защиту карбоксильной и аминной групп тирозина, рекомендованную в работах [5, 6], фосфорилирование его хлорангидридами циклогексилметилфосфоновой и циклогексилдейтерометилфосфоновой кислот, снятие защитных групп с выделением целевых фосфорилированных тирозинов **8a**, **6**.

Защиту L-тироозина **1** осуществляли в две стадии. Сначала L-тирозин **1** обрабатывали бензило-

Схема 1.



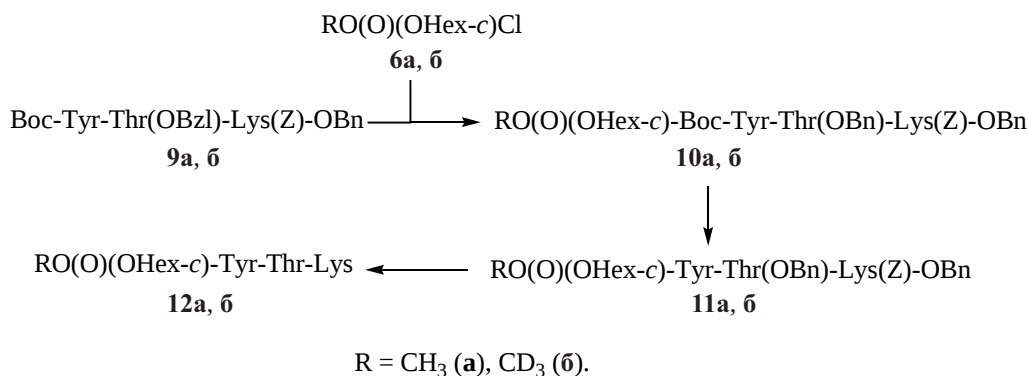
вым спиртом **2** в присутствии стехиометрического количества *n*-толуолсульфокислоты и получали бензиловый эфир L-тирозина в виде соли *n*-толуолсульфоната **3**. Далее, при взаимодействии образовавшейся соли **3** с карбоксибензилхлоридом **4** в присутствии 2 экв. триэтиламина получали бензиловый эфир *N*-карбоксибензил-L-тирозина **5** в виде белого кристаллического порошка.

Необходимые для фосфорилирования циклогексилметил(дейтерометил)хлорфосфонаты **6a, б** были получены по известной методике [13].

В отличие от ранее опубликованной методики [4], фосфорилирование циклогексилметил(дейтерометил)хлорфосфонатами бензинового эфира *N*-карбоксибензил-L-тирозина **5** проводили после

его предварительной обработки гидридом натрия в ацетонитриле. По данным хроматографии и спектроскопии ЯМР, фосфорилированные бензиловые эфиры *N*-карбоксибензил-L-тирозина **7a, б**, полученные в результате реакции в виде вязких жидкостей, содержали много примесей. Для очистки эфиров использовали метод колоночной хроматографии (SiO<sub>2</sub>, элюент – хлористый метилен–этилацетат, 1:1). В результате были выделены продукты с чистотой более 90%. На последней стадии бензильную и карбоксибензильную защиту фосфорилированного L-тирозина **7a, б** снимали с помощью каталитического (10% Pd/C) гидрирования молекулярным водородом при атмосферном давлении. Целевые продукты **8a, б** были получены в виде кристаллических белых порошков, легко

Схема 2.



растворимых в воде, этаноле, плохо – в хлористом метиле, ацетонитриле.

Синтез трипептида Тыр-Тыр-Лис, фосфорилированного циклогексилметил(дейтерометил)хлорфосфонатами осуществляли по схеме 2, включающей взаимодействие хлорангидридов циклогексилметилфосфоновой и циклогексилдейтерометилфосфоновой кислот со свободной фенольной ОН-группой тирозина в составе защищенного тирозилтреониллизина Вос-Тыр-Тыр(ОBzl)-Лис(Z)-ОBn и последующее снятие защитных групп.

Необходимый для фосфорилирования защищенный трипептид Вос-Тыр-Тыр(ОBn)-Лис(Z)-ОBn **9** получали методами классического жидкофазного синтеза пептидов [8–12] по схеме, приведенной в публикации [14].

Взаимодействие трипептида **9** с циклогексилметил(дейтерометил)хлорфосфонатами проводили путем предварительной обработки его суспензии в ацетонитриле гидридом натрия при 5°C с последующим добавлением циклогексилметил(дейтерометил)хлорфосфонатов **6a, б** и выдерживанием при 20°C в течение 2 ч. Полученные аддукты **10a, б** очищали колоночной хроматографией на силикагеле, после чего осуществляли поэтапное снятие защитных Вос и бензильных групп с выделением целевых соединений **11a, б** и **12a, б** по методикам, указанным в работе [14].

Изучение стабильности полученных соединений методами ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P и хромато-масс-спектрометрии показало, что синтезированные продукты являются стабильными в течение 3 мес, что делает возможным их использование в качестве

образцов сравнения при анализе биомедицинских проб.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Регистрацию <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P ЯМР спектров проводили на спектрометре QONE AS 400 при 298 К (399.85 и 161.86 МГц соответственно). Контроль за ходом реакций осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках Marchery-Nagel AlugramSILG/UV254, детектирование проводили на УФ облучателе Ультрамаг-K254/365 при длине волны 254 нм. Регистрацию масс-спектров высокого разрешения проводили с использованием аналитической станции ВЭЖХ-МС Agilent Infinity 1260/Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos в режиме электрораспылительной ионизации.

Для синтеза фосфорилированного трипептида использовали защищенные аминокислоты производства фирмы «AKos» (Германия).

***n*-Толуолсульфонат бензильного эфира L-тирозина (3).** Смесь 10 г (0.055 моль) L-тирозина **1**, 25 мл бензильного спирта **2**, 120 мл толуола и 12.6 г (0.066 моль) моногидрата *n*-толуолсульфокислоты кипятили в течение 7 ч с насадкой Дина–Старка до полного отделения воды. Смесь охлаждали до комнатной температуры, осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром, сушили на воздухе и перекристаллизовывали из этанола. Выход 20.7 г (85%), белые кристаллы.

**Бензильный эфир *N*-карбоксибензил-L-тирозина (5).** К раствору 10.9 г (0.0246 моль) *n*-толуолсульфоната **3** в 100 мл метанола добавляли 5 г (0.0495 моль) триэтиламина. Смесь охлаждали до 0°C и прибавляли 4.2 г (0.0246 моль) карбоксибен-

зилхлорида **4**. Реакционную массу перемешивали 8 ч при 0°C, затем доводили температуру до комнатной. Смесь выливали в 100 мл воды, экстрагировали диэтиловым эфиром (3×100 мл), промывали экстракт водой, насыщенным раствором NaCl, сушили MgSO<sub>4</sub> и концентрировали при пониженном давлении. Остаток перекристаллизовывали из смеси гексан–этанол (2:1). Выход 7.93 (80%), белые кристаллы, т. пл. 102–104°C.

**Общая методика синтеза соединений 7а, б.** К охлажденному до 5°C раствору 0.0042 м. раствора бензилового эфира *N*-карбоксибензил-L-тирозина **5** в 40 мл безводного ацетонитрила при перемешивании прибавляли 120 мг (0.005 моль) NaNH, предварительно отмытого гексаном от минерального масла. Полученную смесь перемешивали 30 мин при комнатной температуре, затем прибавляли 0.005 моль хлорангидрида циклогексилметил(дейтерометил)фосфоновой кислоты **6а, б** и продолжали перемешивание еще 1 ч, контролируя ход реакции по ТСХ. Реакционную смесь упаривали в вакууме до половины объема, выливали в 40 мл воды, экстрагировали хлороформом (3×30 мл). Экстракт промывали 20 мл воды, сушили MgSO<sub>4</sub> и концентрировали при пониженном давлении. Остаток хроматографировали на колонке 150×30 мм (SiO<sub>2</sub>, GeduranSi 60 40–63 мкм, Merck), элюент – метиленхлорид–этилацетат (1:1). Выделены продукты **7а, б** с чистотой 96%,

***O*-(*O*-Циклогексил)метилфосфонат бензилового эфира *N*-карбоксибензил-L-тирозина (7а).** Выход 1.59 г (67%). Спектр ЯМР <sup>31</sup>P (DMCO-*d*<sub>6</sub>): δ<sub>p</sub> 26.87 м. д. Масс-спектр, *m/z*: 566. 6023 [*M* + H]<sup>+</sup>.

***O*-(*O*-Циклогексил)дейтерометилфосфонат бензилового эфира *N*-карбоксибензил-L-тирозина (7б).** Выход 1.51 г (63%). Спектр ЯМР <sup>31</sup>P (DMCO-*d*<sub>6</sub>): δ<sub>p</sub> 27.02 м.д Масс-спектр, *m/z*: 569. 6197 [*M* + H]<sup>+</sup>.

**Общая методика синтеза соединений 8а, б.** В прибор для гидрирования при атмосферном давлении помещали 1.59 г бензилового эфира *O*-(*O*-циклогексил)метилфосфонил-*N*-карбоксибензил-L-тирозина **7а** или 1.51 г бензилового эфира *O*-(*O*-циклогексил)дейтерометилфосфонил-*N*-карбоксибензил-L-тирозина **7б**, 50 мл этанола и 100 мг 10%-ного палладия на активированном угле. Прибор заполняли водородом и встряхивали 8 ч, про-

пуская медленный ток водорода. Катализатор отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме. Остаток растирали с 5 мл ацетонитрила, фильтровали и промывали на фильтре 10 мл диэтилового эфира. Получили *O*-[*O*-циклогексилметил(дейтерометил)фосфонил]-L-тирозины **8а, б** с чистотой около 94%.

***O*-(*O*-Циклогексилметилфосфонил)-L-тирозин (8а).** Выход 0.625 г (65%), белые кристаллы. Спектр ЯМР <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O): δ<sub>p</sub> 31.76 м. д. Масс-спектр, *m/z*: 342.3477 [*M* + H]<sup>+</sup>.

***O*-(*O*-Циклогексилдейтерометилфосфонил)-L-тирозин (8б).** Выход 0.641 г (70%), белые кристаллы. Спектр ЯМР <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O): δ<sub>p</sub> 31.92 м. д. Масс-спектр, *m/z*: 345.3651 [*M* + H]<sup>+</sup>.

Синтез защищенного трипептида Вос-Туг-Thr(OBn)-Lys(Z)-OBn **9** проводили по методикам, изложенным в ранее опубликованной нами работе [14]. Ниже приводятся методики его фосфорилирования циклогексилметил(дейтерометил)хлорфосфонатами и снятия защиты.

**Общая методика синтеза соединений 10а, б.** К охлажденной до 5°C суспензии 0.412 г (0.0005 моль) защищенного трипептида **9** в 40 мл безводного ацетонитрила при перемешивании прибавляли 0.17 г (0.0007 моль) гидрида натрия, предварительно отмытого гексаном от минерального масла. Смесь перемешивали 30 мин при комнатной температуре, затем прибавляли 0.0006 моль циклогексилметил(дейтерометил)хлорфосфоната **6а, б** в 10 мл безводного ацетонитрила и перемешивали 2 ч, контролируя ход реакции методом ТСХ. Реакционную смесь упаривали в вакууме до половины объема, выливали в 40 мл воды и экстрагировали хлороформом (3×30 мл). Экстракт промывали 20 мл воды, сушили MgSO<sub>4</sub>, концентрировали при пониженном давлении. Остаток хроматографировали на колонке 150×30 мм (SiO<sub>2</sub>, GeduranSi 60 40–63 мкм, Merck), элюент – этилацетат–метиленхлорид (3:1). Выделили продукты **10а, б** с чистотой 86% (по данным <sup>31</sup>P ЯМР).

**Бензил-*N*<sup>2</sup>-(*O*-бензил-*N*-{2-[(трет-бутоксикарбонил)амино]-3-(4-{[(циклогексилокси)-(метил)фосфорил]окси}фенилпропаноил)треонил})-*N*<sup>6</sup>-[(бензилокси)карбонил]лизинат (10а).**

Выход 0.417 г (84.6%), полукристаллическая масса. Спектр ЯМР  $^{31}\text{P}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta_{\text{P}}$  26.75 м. д. Масс-спектр,  $m/z$ : 986.1168  $[M + H]^+$ .

**Бензил- $N^2$ -( $O$ -бензил- $N$ -{2-[(*трет*-бутоксикарбонил)амино]-3-(4-{[(циклогексилокси)-(дейтерометил)фосфорил]окси}фенилпропаноил)треонил})- $N^6$ -[(бензилокси)карбонил]лизинат (10б).** Выход 0.424 г (85.8%), полукристаллическая масса. Спектр ЯМР  $^{31}\text{P}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta_{\text{P}}$  26.92 м. д. Масс-спектр,  $m/z$ : 989.1342  $[M + H]^+$ .

**Общая методика синтеза соединений 11а, б.** К 0.424 г фосфорилированного трипептида **10а, б** прибавляли 10 мл 15%-ного раствора безводного  $\text{HCl}$  в диоксане. Смесь перемешивали при комнатной температуре 1 ч, затем удаляли в вакууме растворитель. К остатку добавляли 40 мл этилацетата и раствор промывали 5%-ным раствором гидрокарбоната натрия ( $2 \times 10$  мл), затем 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия в воде. После высушивания сульфатом натрия и отгонки растворителя остаток в виде аморфной белой массы без предварительной очистки подвергали гидрогенолизу для снятия бензильных групп.

**Бензил- $N^2$ -{ $N$ -[2-амино-3-(4-{[(циклогексилокси)(метил)фосфорил]окси}фенил)пропаноил]- $O$ -бензилтреонил}- $N^6$ -[(бензилокси)карбонил]лизинат (11а).** Спектр ЯМР  $^{31}\text{P}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta_{\text{P}}$  26.65 м. д. Масс-спектр,  $m/z$ : 886.0009  $[M + H]^+$ .

**Бензил- $N^2$ -{ $N$ -[2-амино-3-(4-{[(циклогексилокси)(дейтерометил)фосфорил]окси}фенил)пропаноил]- $O$ -бензилтреонил}- $N^6$ -[(бензилокси)карбонил]лизинат (11б).** Спектр ЯМР  $^{31}\text{P}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta_{\text{P}}$  26.83 м. д. Масс-спектр,  $m/z$ : 889.1838  $[M + H]^+$ .

**Общая методика синтеза соединений 12а, б.** В прибор для гидрирования при атмосферном давлении помещали  $\text{Vn}$ -защищенный фосфорилированный трипептида **11а, б**, 50 мл этанола и 50 мг свежеприготовленной гидроокиси палладия. Прибор заполняли водородом и встряхивали 36 ч, пропуская медленный ток водорода, затем добавляли 50 мг свежеприготовленной гидроокиси палладия и продолжали гидрирование еще 36 ч. Контроль реакции осуществляли методом ВЭЖХ-МС, отбирая пробы через каждые 6 ч. Катализатор отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме. Остаток растирали с 5 мл ацетонитрила, фильтровали

и промывали на фильтре 10 мл диэтилового эфира. Получали  $O$ -фосфорилированные трипептиды **12а, б** в виде белой мелкокристаллической массы с чистотой около 70% (по данным ВЭЖХ-МС). Дальнейшую очистку (до 95%) проводили с помощью препаративной ВЭЖХ.

**[2-Амино-3-(4-{[(циклогексилокси)(метил)фосфорил]окси}фенил)пропаноил]треониллизин (12а)** Выход 0.157 г (65%), белые кристаллы. Спектр ЯМР  $^{31}\text{P}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta_{\text{P}}$ , м. д.: 31.60, 31.66. Масс-спектр:  $m/z$ : 571.6239  $[M + H]^+$ .

**[2-Амино-3-(4-{[(циклогексилокси)(дейтерометил)фосфорил]окси}фенил)пропаноил]треониллизин (12б).** Выход 0.173 г (70%), белые кристаллы. Спектр ЯМР  $^{31}\text{P}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta_{\text{P}}$ , м. д.: 31.75, 31.81. Масс-спектр,  $m/z$ : 574.6413  $[M + H]^+$ .

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-13-00057).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and their Destruction, Technical Secretariat of the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, The Hague, 1993. 179 p. [www.opcw.org](http://www.opcw.org)
2. Work instruction for the reporting of the results of the OPCW biomedical proficiency tests. Quality Management System Document no. QDOC/LAB/WI/BioPT04, Revision no. 3. 2019. [www.opcw.org](http://www.opcw.org).
3. Black R.M., Read R.W. // Arch. Toxicol. 2013. Vol. 87. N 3. P. 421. doi 10.1007/s00204-012-1005-1
4. Williams N.H., Harrison J.M., Read R.W., Black R.M. // Arch. Toxicol. 2007. Vol. 81. N 9. P. 627. doi 10.1007/s00204-007-0191-8
5. Sato A., Yoshida M., Hara S. // Chem. Commun. 2008. Vol. 14. N 46. P. 6242. doi 10.1039/B814804J
6. Nakamura H., Fujiwara M., Yamamoto Y. // J. Org. Chem. 1998. Vol. 63. N 21. P. 7529. doi 10.1021/jo980818r

7. Williams N.H., Harrison J.M., Read R.W., Black R.M. // Arch. Toxicol. 2007. Vol. 81. N 9. P. 627. doi 10.1007/s00204-007-0191-8
8. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наукова думка, 1987. 264 с.
9. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Охманович К.А., Федоров В.Е. // Хим.-фарм. ж. 2014. Т. 48. № 3. С. 54. doi 10.30906/0023-1134-2014-48-3-54-56; Balaev A.N., Osipov V.N., Okhmanovich K.A., Fedorov V.E. // Pharm. Chem. J. 2014. Vol. 48. N 3. P. 217. doi 10.1007/s11094-014-1080-0
10. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Федоров В.Е. // Хим.-фарм. ж. 2014. Т. 48. № 5. С. 40. doi 10.30906/0023-1134-2014-48-5-40-42; Balaev A.N., Osipov V.N., Fedorov V.E. // Pharm. Chem. J. 2014. Vol. 48. N 5. P. 340. doi 10.1007/s11094-014-1106-7
11. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Охманович К.А., Ручко Е.А., Колотаев А.В., Хачатрян Д.С. // Изв. АН. Сер. хим. 2016. № 11. С. 2766; Balaev A.N., Osipov V.N., Okhmanovich K.A., Ruchko E.A., Kolotaev A.V., Khachatryan D.S. // Russ. Chem. Bull. 2016. Vol. 65. N 11. P. 2766. doi 10.1007/s11172-016-1651-1
12. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Охманович К.А., Ручко Е.А., Барышникова М.А., Хачатрян Д.С. // Изв. АН. Сер. хим. 2016. № 12. С. 2948; Balaev A.N., Osipov V.N., Okhmanovich K.A., Ruchko E.A., Baryshnikova M.A., Khachatryan D.S. // Russ. Chem. Bull. 2016. Vol. 65. N 12. P. 2948. doi 10.1007/s11172-016-1683-6
13. Briseno-Roa L., Hill J., Notman S., Sellers D., Smith A.P., Timperley C.M., Wetherell J., Williams N.H., Williams G.R., Fersht A.R., Griffiths A.D. // J. Med. Chem. 2006. Vol. 49. N 1. P. 246. doi 10.1021/jm050518j
14. Rodin I.A., Baygildiev T.M., Krylov V.I., Osipov V.N., Krylov I.I., Yashkir V.A., Rybalchenko I.V. // Russ. J. Gen. Chem. 2019. Vol. 89. N 10. P. 2103. doi 10.1134/S1070363219100189

## Phosphorylation of Tyrosin and Tyr-Thr-Lys Tripeptide with Cyclohexylmethyl- and (Deuteromethyl)phosphonochloridates

I. A. Rodin<sup>a,\*</sup>, T. M. Baygildiev<sup>a</sup>, V. I. Krylov<sup>b</sup>, V. N. Osipov<sup>c</sup>, I. I. Krylov<sup>b</sup>,  
V. A. Yashkir<sup>b</sup>, and I. V. Rybalchenko<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup> Laboratory for the Chemical and Analytical Control of the Military Research Center, Moscow, 105005 Russia

<sup>c</sup> Pharm-Sintez, Moscow 111024 Russia

\*e-mail: igorrodin@yandex.ru

Received November 13, 2019; revised December 2, 2019; accepted December 12, 2019

A methods for phosphorylation of tyrosin and Tyr-Thr-Lys tripeptide with cyclohexylmethyl(deuteromethyl)-phosphonochloridates were developed. These products can be used as reference compounds in the analysis of blood plasma of patients probably exposed to cyclohexylmethylphosphonofluoridate (cyclosarin). Conditions for the separation and purification of the synthesized intermediates were determined and optimized, which makes it possible to obtain high-purity phosphorylated products at the final stage of the synthesis.

**Keywords:** biomarker, tripeptide, phosphorylation