



УДК 547.468.057

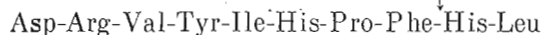
СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ФОСФОНОКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ,
ИНГИБИТОРОВ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

Шулянцева В. В., Гандурина И. А., Холутов Р. М.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

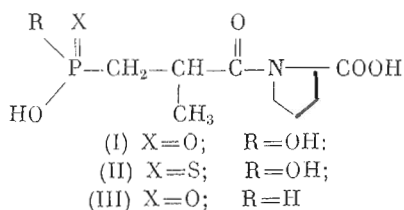
Описан синтез фосфорорганических аналогов дипептидов, содержащих фосфонатную, тиофосфонатную и фосфонитную группы: 2-метил-3-фосфонопропионил-*L*-пролин, 2-метил-3-тиофосфонопропионил-*L*-пролин и 2-метил-3-фосфонитпропионил-*L*-пролин. Все полученные соединения являются ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента.

Среди исследований в ряду обширного класса ферментов, расщепляющих пептидные связи, в последнее время привлекают внимание работы по изучению механизма действия, избирательного торможения и биологических функций ангиотензинпревращающего фермента (КФ 3.4.15.1; фермент также известен в литературе как пептидилдипептидаза, или кининаза II). Ангиотензинпревращающий фермент представляет собой цинкзависимую дипептидилкарбоксипептидазу, которая катализирует отщепление С-концевого дипептида гистидиллейцина от декапептида ангиотензина I с образованием биологически активного ангиотензина II, повышающего артериальное давление.



Кининаза II также инактивирует обладающий депрессорным эффектом пептид брадикинин. Поэтому она является основным ферментом, осуществляющим контроль за концентрацией этих биологически активных пептидов, одна из функций которых — поддержание нормального артериального давления в организме. Поиски эффективных ингибиторов кининазы II представляют интерес не только в плане изучения механизма ферментативного действия, но и для практической медицины с целью получения антигипертензивных препаратов. Один из перспективных подходов к созданию таких ингибиторов заключается в конструировании структур, которые являлись бы специфическими лигандами, способными нековалентно связывать ионы цинка, необходимые для действия фермента.

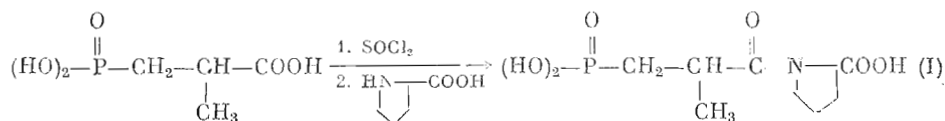
Недавно нами было показано, что 2-метил-3-фосфонопропионил-*L*-пролин является эффективным ингибитором кининазы II [1] *. В этой работе описывается синтез этого соединения (I), а также его аналогов (II) и (III), содержащих вместо фосфонатной тиофосфонатную и фосфонитную группы.



2-Метил-3-фосфонопропионил-*L*-пролин (I) может быть получен классическими методами пептидной химии, подразумевающими защиту как

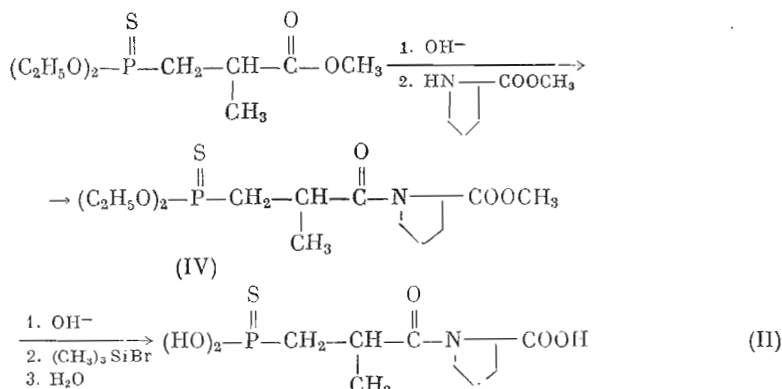
* Одновременно появилось сообщение о получении этого соединения другими авторами [2].

фосфонатной группы 2-метил-3-фосфонопропионовой кислоты, так и карбоксильной группы *L*-пролина с последующим снятием защитных групп. Основываясь на особенностях реакционной способности фосфонокарбоновых кислот, мы осуществили одностадийный синтез соединения (I) без предварительной защиты функциональных групп:



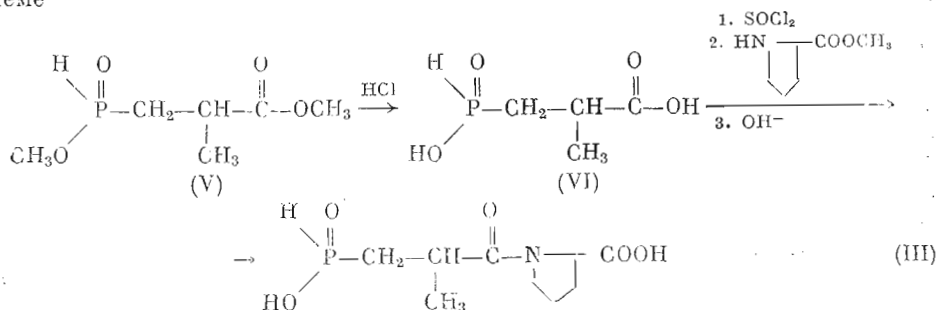
Согласно предлагаемой схеме, активированную хлористым тионилем 2-метил-3-фосфонопропионовую кислоту вводили в реакцию с литиевой солью *L*-пролина в водно-органической среде. Выход продукта (I) после очистки на анионообменнике составил 20%.

2-Метил-3-тиофосфонопропионил-*L*-пролин (II) был синтезирован из метилового эфира 2-метил-3-диэтилтиофосфонопропионовой кислоты [3] и метилового эфира *L*-пролина карбодимидным методом по схеме



Кислый гидролиз эфирных групп тиофосфоновых кислот протекает обычно с отщеплением серы от тиофосфоновой группы и заменой ее на кислород [4]. Для деалкилирования лабильных производных фосфоновых и тиофосфорных кислот весьма эффективны триметилгалюидсиланы [5, 6]. Триметилбромсилан был применен нами для снятия этоксигрупп с 2-метил-3-диэтилтиофосфонопропионил-*L*-пролина (IV), причем пептидная связь оказалась устойчивой в условиях деблокирования. После гидролиза образовавшихся силильных эфиров водным аммиаком соединение (II) было получено с выходом 55%.

2-Метил-3-фосфонистопропионил-*L*-пролин (III) был синтезирован по схеме



Использованная в синтезе ранее не описанная 2-метил-3-фосфонистопропионовая кислота (VI) была получена присоединением метилтиофосфита [7, 8] к метилметакрилату в присутствии метилата натрия с последующим кислотным гидролизом эфира (V). Окисление 2-метил-3-фосфонистопропионовой кислоты однозначно дает 2-метил-3-фосфонопропионовую кислоту (VI). Спектр ¹H-ЯМР также свидетельствует в пользу структуры с P—N-связью, так как содержит дублет с химическим сдви-

гом 6,48 м. д. (J 500 Гц). В ИК-спектре кислоты (VI) наблюдается полоса поглощения при 2350 см^{-1} , что также соответствует наличию Р—Н-связи. Для получения соединения (III) кислоту (VI) активировали хлористым тионилем и вводили в реакцию с метиловым эфиром *L*-пролина. После омыления метоксигруппы реакционную смесь хроматографировали на дауэксе 1×2 (HCO_3^- -форма). Строение соединения (III) подтверждено ИК- и ^1H -ЯМР-спектрами; оно окисляется бромом или 30% H_2O_2 с образованием соединения (I) и присоединяет серу с образованием соединения (II) [9].

Таким образом, синтезированы фосфорорганические аналоги дипептидов, содержащие фосфонатную, тиофосфонатную и фосфонитную группы. Показана возможность использования триметилбромсилана для деалкилирования тиофосфоновых кислот.

Синтезированные соединения эффективно и избирательно ингибировали ангиотензинпревращающий фермент ($I_{50} 10^{-5}—10^{-7}$ М). Более подробные данные по взаимодействию структур подобного типа с ангиотензинпревращающим ферментом будут опубликованы в отдельном сообщении.

Экспериментальная часть

Спектры ИК и ^1H -ЯМР, ^{31}P -ЯМР снимали на приборах Spесord-71 IR (ГДР) и Varian-XL-100-15 (100 МГц) (США). В качестве внутреннего стандарта для ^1H -ЯМР применяли *трет*-бутанол, в качестве внешнего стандарта для ^{31}P -ЯМР—85% H_3PO_4 .

ТСХ проводили на пластинках с силикагелем Silufol в системах *n*-пропанол — конц. аммиак — вода, 6 : 3 : 1 (А) и изопропанол — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б). Обнаружение пятен на хроматограммах проводили нингидрином, молибдатом аммония и 1% водным раствором нитрата серебра (для серосодержащих соединений).

2-Метил-3-фосфонопропионил-*L*-пролин (I). 672 мг (4 ммоль) сухой, тщательно измельченной *DL*-2-метил-3-фосфонопропионовой кислоты добавляли порциями при перемешивании к 10 мл свежеперегнанного SOCl_2 и оставляли при перемешивании на 24 ч при 18°C без доступа влаги. Затем упаривали в вакууме до масла, остаток высушивали в вакуум-эксикаторе над КОН, растворяли в 5 мл абс. хлороформа и медленно добавляли по каплям при перемешивании к охлажденному до 0°C раствору 4 ммоль литиевой соли *L*-пролина в 5 мл воды, поддерживая рН реакционной смеси в интервале 7—8 добавлением насыщенного раствора LiOH. Через 12 ч упаривали реакционную смесь досуха. Остаток растворяли в минимальном количестве воды и обессоливали на колонке с дауэксом 50×8 (H^+ -форма, 100—200 меш, 100 мл). Обогащенные фракции концентрировали в вакууме, нейтрализовали аммиаком и очищали на колонке с дауэксом 1×2 (HCO_3^- -форма, 100—200 меш, 150 мл), используя линейный градиент NH_4HCO_3 (1 л 0,2 М \rightarrow 1 л 2 М). Содержащее соединение (I) фракции (концентрация NH_4HCO_3 0,85 М) объединяли, упаривали, добавляли водный этанол и упаривали повторно для удаления NH_4HCO_3 , остаток лиофилизвали. Выход диаммониевой соли (I) 238 г (20%) (в расчете на 2-метил-3-фосфонопропионовую кислоту). R_f 0,22 (А). Спектр ^1H -ЯМР (D_2O , δ , м. д.): 1,05 д (3H, CH_3 , J 8 Гц), 1,95 м (6H, CH_2), 2,44 д (2H, CH_2 —P, J 22 Гц), 3,5 т (1H, CH , J 6 Гц), 4,6 м (1H, CH). ^{31}P -ЯМР—22,9 м. д. Соединение (I) после гидролиза 6 н. HCl в течение 24 ч при 110°C дает в качестве единственных продуктов пролин и 2-метил-3-фосфонопропионовую кислоту (контроль ТСХ со «свидетелями»). Для диаммониевой соли (I) найдено, %: С 36,19; Н 7,01; Р 10,53; N 14,07. $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}_3\text{P}$. Вычислено, %: С 36,24; Н 7,0; Р 10,44; N 14,0%. ИК-спектр (в вазелиновом масле) 1650 см^{-1} . Диаммониевая соль соединения (I) представляет собой белый, негигроскопичный порошок, устойчивый при хранении, хорошо растворимый в воде, мало растворимый в спирте, нерастворимый в органических растворителях (эфир, хлороформ).

2-Метил-3-тиофосфонопропионил-*L*-пролин (II). 2,5 г (0,01 ммоль) метилового эфира 2-метил-3-диэтилтиофосфонопропионовой кислоты, полу-

ченной согласно работе [4], растворяли в 10 мл диоксана и прибавляли при перемешивании на магнитной мешалке 30 мл смеси спирт — 2 н. NaOH (5 : 1). Через 1 ч прибавляли 50 мл хлороформа, подкисляли 2 н. H₂SO₄ до pH 3—4; хлороформный слой отделяли, водный экстрагировали хлороформом (2 × 30 мл). Хлороформные экстракты объединяли, сушили MgSO₄ и упаривали. Получено 2,35 г (98%) маслообразного продукта. R_f 0,57 (Б).

К раствору 410 мг (2,5 ммоль) хлоргидрата метилового эфира *L*-пролина в 5 мл хлороформа прибавляли 0,36 мл (2,5 ммоль) триэтиламина и смешивали с раствором 600 мг (2,5 ммоль) 2-метил-3-диэтилтиофосфонопропионовой кислоты [3] в 5 мл хлороформа. Затем прибавляли 515 мг (2,5 ммоль) *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида и перемешивали 12 ч при 18° С. Осадок дициклогексилмочевины отделяли фильтрацией и хлороформ упаривали в вакууме. Полученное масло растворяли в этилацетате, оставляли на 1 ч при 4° С, хлоргидрат триэтиламина отфильтровывали, раствор промывали 2 раза 0,5 н. HCl, водой, 3% NaHCO₃, снова водой и сушили MgSO₄. Этилацетат отгоняли в вакууме. Выход метилового эфира 2-метил-3-диэтилтиофосфонопропионил-*L*-пролина (IV) 820 мг (75%). R_f 0,91 (Б). ИК-спектр (CHCl₃, ν, см⁻¹): 2920, 2880, 2100, 1740, 1650, 1440, 1240, 1040, 980, 850.

340 мг (1 ммоль) метилового эфира (IV) растворяли в 2 мл спирта, прибавляли 0,5 мл 2 н. NaOH, а через 3 ч — по 2 мл воды и хлороформа. Раствор подкисляли 2 н. H₂SO₄ до pH 3—4, хлороформ отделяли, водный слой промывали хлороформом. Объединенные хлороформные экстракты сушили MgSO₄ и упаривали. Полученное масло растворяли в 2 мл хлороформа и прибавляли 3,1 г (20 ммоль) триметилбромсилана [5, 6]. Перемешивали 48 ч при 18° С без доступа влаги и упаривали. Остаток растворяли в 20 мл 1% водного аммиака, перемешивали 2 ч, затем экстрагировали хлороформом (3 × 10 мл). Водную фазу, содержащую диаммониевую соль (II), концентрировали до небольшого объема и лиофилизировали. Выход 148 мг (55%). R_f 0,20 (А), 0,14 (Б).

Спектр ¹H-ЯМР (D₂O, δ, м. д.): 1,1 д (3H, CH₃, J 8 Гц), 1,9 д (6H, CH₂, J 4 Гц), 2,4 д (2H, CH₂-P, J 22 Гц), 3,5 т (1H, CH, J 6 Гц), 4,5 м (1H, CH). ³¹P-ЯМР: —34,5 и —16,6 м. д.

Гидролиз соединения (II) 6 н. HCl при 110° С в течение 24 ч приводил к пролину и 2-метил-3-фосфонопропионовой кислоте (контроль ТСХ).

2-Метил-3-фосфоноистопропионил-L-пролин (III). К 0,1 моль метилгипофосфита, полученного по работе [7] из фосфорноватистой кислоты и метилортоформиата (Fluka), прибавляли 10 мл (0,1 моль) метилметакрилата и затем медленно, по каплям, метилат натрия (до pH 8—9). Кипятили 3 ч, упаривали в вакууме, остаток растворяли в 10 мл воды и экстрагировали хлороформом (3 × 10 мл). Объединенные хлороформные вытяжки сушили MgSO₄, фильтрат упаривали. Получено 10,8 г (60%) метилового эфира 2-метил-3-О-метилфосфоноистопропионовой кислоты (V). ИК-спектр (CHCl₃, ν, см⁻¹): 2900, 2350, 1710, 1460, 1180. 900 мг (5 ммоль) полученного соединения (VI) растворяли в 100 мл 20% HCl и кипятили 5 ч в атмосфере азота. Упаривали многократно с водой для удаления HCl, сушили в вакуум-эксикаторе над P₂O₅ и KOH. Получали маслообразный продукт (VI). Спектр ¹H-ЯМР (D₂O, δ, м. д.): 1,25 д (3H, CH₃, J 8 Гц), 2,44 д (2H, CH₂, J 6 Гц), 2,44 д (2H, CH₂-P, J 22 Гц), 3,42 к (1H, CH, J 6 Гц), 3,66 т (1H, CH, J 8 Гц), 6,78 д (1H, P—H, J 500 Гц).

К раствору 760 мг (5 ммоль) 2-метил-3-фосфоноистопропионовой кислоты (VI) в 5 мл абс. хлороформа прибавляли 5 мл свежеперегнанного SOCl₂, перемешивали 24 ч при 18° С без доступа влаги и упаривали в вакууме. Маслообразный остаток высушивали в вакуум-эксикаторе над KOH, растворяли в 5 мл абс. хлороформа и прибавляли к раствору 810 мг (5 ммоль) хлоргидрата метилового эфира *L*-пролина в 5 мл хлороформа, содержащего 1,5 мл (10 ммоль) триэтиламина. Через 12 ч раствор упаривали, масло растворяли в этилацетате и оставляли на 1 ч при 4° С. Хлоргидрат триэтиламина отфильтровывали, раствор промывали 2 раза 0,5 н. HCl, водой, 3% NaHCO₃, снова водой, сушили MgSO₄. Этилацетат упари-

вали, остаток растворяли в 10 мл этанола и прибавляли 2,5 мл 2 н. NaOH. Через 3 ч реакционную смесь обрабатывали дауэксом 50×8 (H⁺-форма) и отфильтровывали. Фильтрат доводили аммпаком до pH 7 и наносили на колонку с дауэксом 1×2 (HCO₃⁻-форма, 200 мл), элюировали в линейном градиенте NH₄HCO₃ (1 л 0,2 М — 1 л 1 М NH₄HCO₃). Содержащее соединение (III) фракции, выходящие при 0,70 М концентрации NH₄HCO₃, упаривали с водой и этанолом, лиофилизовали. Выход диаммониевой соли (III) 420 мг (30%). R_f 0,25 (А), 0,20 (Б). При гидролизе соединения (III) 6 н. HCl (110° С, 24 ч) образовывались пролин и продукт окисления 2-метил-3-фосфонистопропионовой кислоты — 2-метил-3-фосфонопропионовая кислота (контроль ТСХ). Спектр ¹H-ЯМР (D₂O, δ, м. д.): 1,24 д (3H, CH₃, J 8 Гц), 1,6—2,2 м (6H, CH₂), 3,6 т (1H, CH, J 6 Гц), 4,3 м (1H, CH), 6,78 д (1H, P—H, J 500 Гц). ³¹P-ЯМР —25,2 м. д.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хурс Е. Н., Гандурина И. А., Шумянцева В. В., Казарян Т. Р., Хомутов Р. М. Тез. Всесоюз. симп. «Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов». Рига, 1982, с. 96.
2. Thorsett E. D., Harris E., Peterson E., Greenlee W. J., Patchett A., Ulm E. H., Vassil T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 7, p. 2176—2180.
3. Кузмин В. А., Орехова М. К. Журн. общ. химии, 1958, т. 28, № 10, с. 2790—2797.
4. Пудовик Д. Х., Ярмухаметова Д. Х. Изв. АН СССР. Отд. хим. наук, 1954, № 4, с. 636—645.
5. Zigmunt J., Kafarski P., Mastalerz P. Synthesis, 1978, № 8, p. 609—612.
6. Chojnowski J., Cypryk H., Michalski J. Synthesis, 1978, № 10, p. 777—779.
7. Fitch S. J. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 1, p. 61—64.
8. Maier L. Helv. chim. acta, 1973, v. 56, Fasc. 1, № 41, p. 489—491.
9. Нифантьев Э. Е., Щенатьева И. П., Магдеева Р. К. Журн. общ. химии, 1979, т. 49, № 8, с. 1905—1906.

Поступила в редакцию
2.VIII.1985

SYNTHESIS OF AMINO-ACID DERIVATIVES OF PHOSPHONOCARBOXYLIC ACIDS AS INHIBITORS OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME

SHUMYANTSEVA V. V., GANDURINA I. A., KHOMUTOV R. M.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Analogues of dipeptides containing phosphonic, thiophosphonic and phosphonous acids having the general structure (R) (HO) P(X)·CH₂CH(CH₃)C(O)N(CH₂)₃CHCOOH (R = OH, H; X = O; S) were synthesized. The obtained compounds were characterized by IR, ¹H and ³¹P NMR spectra. All of them proved to be potent inhibitors of angiotensin converting enzyme ($I_{50} 10^{-5}$ — 10^{-7} M).