



УДК 577.152.344

Посвящена памяти В.М. Степанова,  
руководившего работами  
по ферментативному синтезу  
пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов

## СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ НА С-КОНЦЕ $\alpha$ -АМИНОАЛЬДЕГИДЫ

© 2001 г. Ж. В. Потетинова\*, Е. И. Мильготина, В. А. Макаров\*, Т. Л. Воюшина

Государственный научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, лаборатория химии белка им. В.М. Степанова,  
113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1;

\* Гематологический научный центр РАМН, лаборатория патологии и фармакологии гемостаза, Москва

Поступила в редакцию 24.11.2000 г. Принята к печати 15.01.2001 г.

Рассмотрены различные методы получения модифицированных пептидов – пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов, обладающих способностью ингибировать целый ряд протеолитических ферментов, относящихся к классу тиоловых, сериновых и аспартильных протеиназ. Подробно обсуждаются химические пути синтеза пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов, в том числе и широко используемые в настоящее время твердофазные методы синтеза, а также биокаталитические способы получения данного класса соединений.

*Ключевые слова:* пептидил- $\alpha$ -аминоальдегиды; химический синтез; ферментативный синтез; ингибиторы протеиназ.

### Введение.

1. Оптическая стабильность пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов.

2. Химические методы синтеза пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов.

2.1. Конденсация производных  $\alpha$ -аминоальдегидов с эфирами *N*-защищенных аминокислот и пептидов.

2.2. Получение через лактам аргинина.

2.3. Твердофазный синтез.

2.4. Получение через модифицированные пептиды или производные пептидов.

3. Ферментативные пути синтеза пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов.

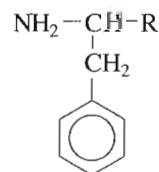
### Заключение.

Сокращения: Pheol – фенилаланинол ( $\beta$ -аминоспирт); Pheal – фенилаланиналь ( $\alpha$ -аминоальдегид); Pheal=Sem – семикарбазон фенилаланиналя; MBNA – *n*-метилбензгидриламил; Aloc – аллилксикарбонил; WOP – гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония; DIPEA – *N,N*-диизопропилэтиламин; Pr – пропионил; Tig – 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил-карбонил.

\* Автор для переписки (e-mail: potetinov@hotmail.com; тел.: (095) 315-37-38; факс: (095) 315-05-01).

### ВВЕДЕНИЕ

Пептидил- $\alpha$ -аминоальдегиды (пептидальдегиды) – модифицированные пептиды, имеющие на С-конце аналог  $\alpha$ -аминокислоты –  $\alpha$ -аминоальдегид.



R = COOH Фенилаланин (Phe)

R = CH<sub>2</sub>OH Фенилаланинол (Pheol)

R = C(O)H Фенилаланиналь (Pheal)

R = CHNHNHCONH<sub>2</sub> Семикарбазон  
фенилаланиналя (Pheal=Sem)

Пептидальдегиды представляют собой ингибиторы тиоловых и сериновых протеиназ [1–3]. При взаимодействии с сериновой протеиназой пептидная часть подобной молекулы контактирует с субстратсвязывающим участком фермента, а альдегидная группа образует тетраэдрический полуацеталь с гидроксилом серина активного центра – непродуктивный аналог переходного состояния [4]. В последнее время появились данные

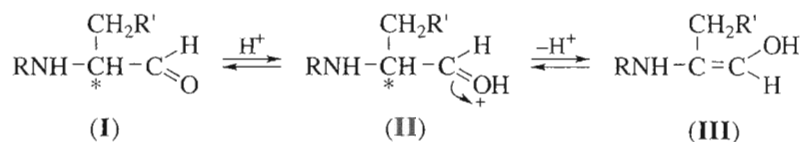


Схема 1. Механизм рацемизации защищенных  $\alpha$ -аминоальдегидов [20].

о том, что пептидил- $\alpha$ -аминоальдегиды ингибируют также и аспартильные протеиназы (HIV-протеиназы [5], ренин [6] и конвертазы [7]). Механизм этого процесса изучен пока недостаточно, высказано лишь предположение, что они образуют, подобно сериновым и тиоловым протеиназам, тетраэдрическую гидратированную форму – аналог переходного состояния [8]. Константы ингибирования пептидальдегидами различных классов протеиназ колеблются в пределах  $10^{-6}$ – $10^{-9}$  М.

Пептидальдегиды – обратимые ингибиторы, тем не менее они могут оказаться весьма эффективными лекарственными препаратами. Так, например, пептидальдегиды, содержащие остатки Nvaal и Nleal, являются ингибиторами протеасомы – ключевого мультиферментного комплекса многих катаболических каскадов [9]. В ряде работ, опубликованных в последнее время, показано, что соединения Z-Leu-Leual и Z-Leu-Leu-Nvaal могут быть использованы для лечения болезни Альцгеймера [10]. Особый интерес представляют производные пептидов, имеющие на C-конце аргининаль или лизиналь [11, 12], ингибирующие сериновые протеиназы, входящие в состав системы гемостаза. Пептидальдегиды, содержащие на C-конце модифицированные остатки Glu и/или Asp, способны ингибировать глутамил- и/или аспарагилспецифичные эндопептидазы, многие из которых имеют важное биологическое значение (интерлейкин-1 $\beta$ -превращающий фермент [13], гранзим В [14]). В вирусе гепатита А, полио- и риновирусах человека был обнаружен ряд вирусных сериновых протеиназ, гидролизующих пептидные связи типа Glu–Xaa и Gln–Xaa и играющих ключевую роль в процессинге вирусных полипептидов в функциональные продукты [15]. Ингибиторами подобных ферментов могут служить производные пептидов, имеющие на C-конце альдегиды глутаминовой кислоты или глутамина. Пептидальдегиды, содержащие на C-конце остатки гидрофобных аминокислот, являются ингибиторами целого ряда тиоловых протеиназ (принадлежащих семейству папаина), необходимых для внутриклеточной репликации и дифференциации многим патогенным микроорганизмам (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum*) [16].

Кристаллизация ферментов в комплексе с пептидальдегидами в значительной степени облегчает определение структуры этих ферментов методом

рентгеноструктурного анализа [17]. При иммобилизации пептидальдегидов на носителе получают специфичные аффинные сорбенты [18, 19], применение которых открывает новые перспективы для выделения и исследования протеолитических ферментов.

### 1. ОПТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ПЕПТИДИЛ- $\alpha$ -АМИНОАЛЬДЕГИДОВ

N-Защищенные  $\alpha$ -аминоальдегиды и пептидил- $\alpha$ -аминоальдегиды – обычно бесцветные кристаллы или масла. Они хорошо растворимы в органических растворителях, относительно нестабильны как химически, так и конфигурационно, особенно в растворе. По этой причине для доказательства структуры пептидальдегидов чаще всего используют метод  $^1\text{H}$ -ЯМР: протону СНО-группы отвечает сигнал при  $\delta$  9.5–10 м.д. Пептидил- $\alpha$ -аминоальдегиды, как и  $\alpha$ -аминоальдегиды, легко рацемизируются, особенно при контакте с силикагелем, который часто используют для очистки этого класса соединений методом флэш-хроматографии. Механизм рацемизации N-защищенных  $\alpha$ -аминоальдегидов (I) на силикагеле включает стадии протонирования (II) и енолизации (III) (схема 1) [20].

Оптическая стабильность некоторых N-защищенных  $\alpha$ -аминоальдегидов при хроматографии на силикагеле была впервые изучена Ито и соавт. [20]. В соответствии с их данными, Z-L- $\alpha$ -аминоальдегиды можно расположить в порядке уменьшения склонности к рацемизации на силикагеле следующим образом: Z-S-Bzl-L-цистеиналь  $\gg$  Z-L-фенилаланиналь  $>$  Z-L-лейциналь  $\gg$  Z-N<sup>G</sup>-нитро-L-аргининаль. Следует отметить, что альдегиды с R'-группой, стабилизирующей енольную форму, например Z-S-Bzl-L-цистеиналь, рацемизируются при контакте с силикагелем наиболее быстро. Добавление 0.1% пиридина к элюирующей системе растворителей позволяет значительно уменьшить потерю оптической активности [21].

Пептидиларгининали и пептидиллизинали, кроме енольной и свободной альдегидной форм, имеют циклическую форму. Именно с существованием циклической карбиноламинной структуры (V), которая препятствует процессу рацемизации, авторы связывают относительную оптическую устойчивость Z-N<sup>G</sup>-нитро-L-аргининаля (схема 2) [20]. Таким образом, оптическая лабильность  $\alpha$ -амино-

альдегидов в значительной мере зависит от их структуры.

Существенное понижение температуры хранения  $\alpha$ -аминоальдегидов способствует сохранению конфигурации этих соединений. Так, при  $-30^{\circ}\text{C}$  Вос-*L*-Leual практически не рацемизируется в течение 9 сут, в то время как при комнатной температуре в течение такого же периода времени это соединение рацемизируется на 30% [22].

Для сохранения оптической активности  $\alpha$ -аминоальдегиды превращают в более стабильные производные (семикарбазоны [23, 24], имидазолидины [25] или ацетали [26]), которые очищают хроматографией, а затем удаляют защитные группы с альдегидной функции.

## 2. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СИНТЕЗА ПЕПТИДИЛ- $\alpha$ -АМИНОАЛЬДЕГИДОВ

Для синтеза пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов наиболее часто используют два возможных пути. Один из них заключается в конденсации защищенных по карбонильной группе производных аминокислот и ацилпептидов с последующим высвобождением альдегидной группы, второй основан на окислении пептидил- $\beta$ -аминоспиртов.

Существует довольно много химических методов получения  $\alpha$ -аминоальдегидов, хотя все их можно свести либо к реакциям восстановления, либо к реакциям окисления. Большинство из этих методов подробно описаны в книге "Модифицированные аминокислоты и пептиды на их основе" под редакцией Чипенса [27], а более поздние работы суммированы в литературном обзоре диссертации Потетиновой [28].

### 2.1. Конденсация производных $\alpha$ -аминоальдегидов с эфирами *N*-защищенных аминокислот и пептидов

$\alpha$ -Аминоальдегиды, полученные химическими или ферментативными методами и защищенные по карбонильной группе, могут применяться в пептидном синтезе. Для получения пептидальдегидов чаще всего в качестве аминокислотного компонента используют ацетали или семикарбазоны аминокислот. Например, *N*<sup>α</sup>-*Z*-*N*<sup>G</sup>-нитро-*L*-аргининаль превращали в семикарбазон [23], затем удаляли *Z*-защиту НВг в уксусной кислоте. Полученный семикарбазон *N*<sup>G</sup>-нитро-*L*-аргининаля (VI) вводили в реакцию с *N*-оксисукцинимидным эфиром *Z*-*L*-лейцина (схема 3). Разлагая семикарбазон *Z*-*L*-лейцил-*N*<sup>G</sup>-нитро-*L*-аргининаля (VII) формалином в солянокислом растворе, получали *Z*-*L*-лейцил-*N*<sup>G</sup>-нитро-*L*-аргининаль (VIII) с выходом более 60%.

По аналогичной методике из соответствующих *N*-оксисукцинимидных эфиров ацилированных ди-

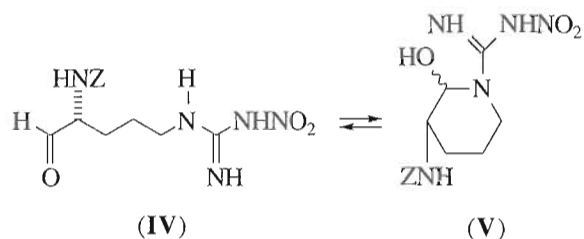


Схема 2. Таутомерные формы *Z*-*N*<sup>G</sup>-нитро-*L*-аргининаля [20].

пептидов и семикарбазона аргининаля синтезировали лейпептины Ac-Leu-Leu-Argal (Ac-LL), Pr-Leu-Leu-Argal (Pr-LL) и их аналоги, содержащие валин или изолейцин вместо одного или двух остатков лейцина [24]. Следует подчеркнуть, что некоторые авторы при синтезе пептидальдегидов предпочитали получать производные аргининаля, расщепляя природный лейпептин, предварительно превращенный в ацеталь [29, 30].

Аналоги лейпептина, пептидиллизинали и пептидилорнитинали, были получены конденсацией *Z*-защищенных пептидов и семикарбазонов соответствующих производных  $\alpha$ -аминоальдегидов (*N*<sup>ε</sup>-Вос-Lysal=Sem и *N*<sup>δ</sup>-Вос-Ornal=Sem) с выходами 31–42% [31]. Для удаления Вос-группы и защиты с альдегидной функции семикарбазоны пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов обрабатывали формалином в кислой среде (выходы 25–65%).

Ито и соавт. [32] описали реакцию конденсации семикарбазонов  $\alpha$ -аминоальдегидов Pheal, Tyrал, Trpal с дипептидом Ac-Leu-Leu азидным методом. После удаления семикарбазона получали пептидальдегиды со свободной альдегидной функцией.

Производные пролиналя *Z*-Val-Proal, *Z*-Ala-Proal и *Z*-Phe-Proal, являющиеся специфичными ингибиторами пролиновой эндопептидазы (сериновой протеиназы, расщепляющей связи Pro-Xaa), получали путем ацилирования семикарбазона пролиналя *n*-нитрофениловым эфиром *Z*-аминокислоты с последующим расщеплением семикарбазона формалином в кислой среде [33].

Масаки и соавт. [26] синтезировали *Z*-Val-Lysal конденсацией ацетала аминокислоты Lysal(Вос)(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> с *Z*-*L*-Val-OH (выход 60%) с последующей обработкой *Z*-Val-Lysal(Вос)(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> трифторуксусной кислотой для одновременного удаления *N*<sup>ε</sup>-защиты и ацетала с альдегидной функции (выход 43%). По этой же схеме получали *Z*-Pro-Lysal, *Z*-Leu-Leu-Lysal и *Z*-Leu-Pro-Lysal.

Пептидальдегид Ac-Tyr-Val-Ala-Aspal – ингибитор интерлейкин-1 $\beta$ -превращающего фермента – синтезировали по следующей схеме [34]:  $\beta$ -трет-бутиловый эфир Aloc-*L*-аспарагиновой кислоты восстанавливали боргидридом натрия в



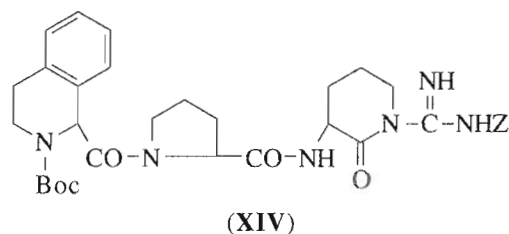
го ингибитора тромбина синтезировали серию *N*-алкилированных пептидиларгининалей.

Этим же способом авторы работы [35] синтезировали *N*-[3-(3-пиридил)пропионил]пролиларгининаль (XIII), который является ингибитором тромбина и трипсина (схема 4). Лактам *N*<sup>α</sup>-Вос-*N*<sup>β</sup>-*Z*-*L*-аргинина (IX) получали обработкой хлоргидрата Вос-*L*-Argal карбобензоксихлоридом в присутствии триэтиламина в тетрагидрофуране с выходом 21.6%. После удаления Вос-защиты соляной кислотой в смеси хлористого метилена и этилацетата (с выходом 97%) лактам *N*<sup>β</sup>-*Z*-*L*-аргинина (X) конденсировали с *N*-[3-(3-пиридил)пропионил]пролином в присутствии дифенилфосфорилиазида и триэтиламина в DMF. Образовавшийся лактам дипептида (XI) (выход 33%) восстанавливали до альдегида (XII) алюмогидридом лития в THF. Гидрогенолизом над Pd/C снимали *Z*-защиту и получали *N*-[3-(3-пиридил)пропионил]пролиларгининаль (XIII) в виде дигидрохлорида с выходом 57%.

Дипептидил-α-аминоальдегид *D*-Tig-Pro-Argal (XIV) – сильный селективный ингибитор тромбина [36] – получали реакцией Вос-*D*-Tig-Pro-OH с лактамом *N*<sup>β</sup>-*Z*-*L*-Arg в присутствии изовалерианового эфира хлоругольной кислоты и *N*-метилморфолина. Дальнейшее восстановление лактама трипептида и удаление защитной группы проводили аналогично вышеописанной схеме.

### 2.3. Твердофазный синтез

Ферентц и Мартинес предложили твердофазный метод синтеза пептидил-α-аминоальдегидов на MBHA-полимере, в основе которого лежит восстановление *N*-метокси-*N*-метилкарбоксамидов алюмогидридом лития [37]. В качестве линкера был использован NH(OCH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH-. В соответствии со схемой 5 были получены *N*-за-



щищенные три- и дипептидил-α-аминоальдегиды (таблица). Во всех случаях реакции проходили через стадию образования стабильного промежуточного комплекса с литием, который препятствовал дальнейшему восстановлению. После гидролиза и последующего восстановления пептидил-α-аминоальдегиды очищали методом флэш-хроматографии на силикагеле в эфире в присутствии 0.1% пиридина или методом ВЭЖХ. Было показано, что этот метод синтеза свободен от рацемизации. Полученные с выходами 25–40% пептидил-α-аминоальдегиды были охарактеризованы с помощью аналитической ВЭЖХ, <sup>1</sup>H-ЯМР и методом дисперсии оптического вращения.

Эти же авторы пытались получить пептидил-α-аминоальдегиды на той же смоле, используя другой линкер XNH-CH(R)-COO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CONH- и иной способ синтеза [38]. Основа этого метода – восстановление *N*-защищенных α-аминофеноловых эфиров AlLiH(OBu<sup>t</sup>)<sub>3</sub>. Во всех случаях получали смесь пептидил-α-аминоальдегида и пептидил-β-аминоспирта (таблица).

В группе Мартинеса в последние годы активно модернизируют твердофазный метод синтеза пептидил-α-аминоальдегидов [39, 40], который, пожалуй, является наиболее перспективным. Полученные в результате реакции *N*-защищенных α-аминоальдегидов с (карбэтоксиметилен)трифенилфосфораном β-аминопроизводные фиксиро-

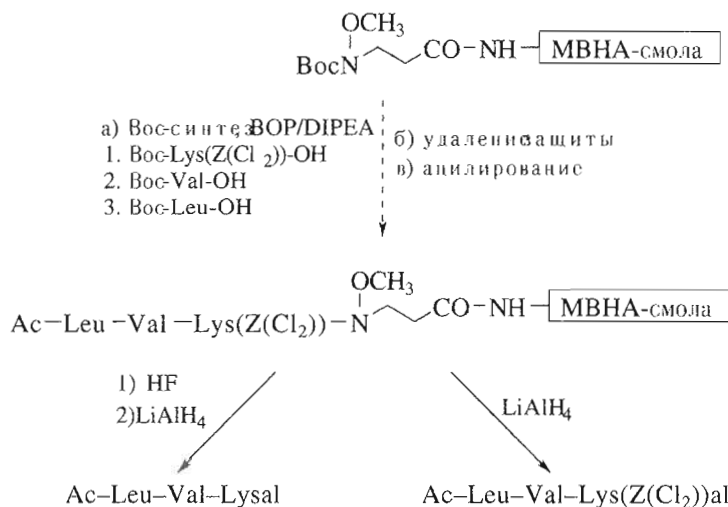


Схема 5. Схема твердофазного синтеза пептидил-α-аминоальдегидов [37].

Твердофазный синтез пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов [37]

Пептидил- $\alpha$ -аминоальдегид	$[\alpha]_D$ (с 1, MeOH)	Выход, %		Альдегид/спирт**
		Метод А*	Метод Б**	
Boc-Phe-Val-Ala <sup>al</sup>	-21	40	45	75/25
Boc-Leu-Leu-Lysal(Z(Cl <sub>2</sub> ))	-50	40	-	-
Ac-Leu-Val-Lysal(Z(Cl <sub>2</sub> ))	-42	25	51	
Z-Val-Pheal	-45	30	45	75/25
Z-Val-Ala <sup>al</sup>	-	-	30	50/50
Boc-Val-Valal	-	-	30	0/100

\* Синтез через *N*-метокси-*N*-метилкарбоксамиды; \*\* синтез через  $\alpha$ -аминофениловые эфиры; приводит к смеси пептидил- $\alpha$ -аминоальдегида и пептидил- $\beta$ -аминоспирта.

вали на смоле, твердофазным методом наращивали пептидную цепь и затем в результате озонлиза получали чистый пептидил- $\alpha$ -аминоальдегид без рацемизации *C*-концевого остатка, содержащего альдегидную группу [39]. По такой схеме было синтезировано 27 трипептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов [40].

Мерфи и соавт. [41] синтезировали пептидальдегиды, фиксируя на смоле семикарбазоны и наращивая затем пептидную цепочку с *N*-конца (схема 6). Таким способом было получено более

100 пептидальдегидов, содержащих *C*-концевые остатки Argal, Pheal, Valal и др. Выходы на каждой стадии составляли около 90%.

Твердофазную стратегию синтеза модифицированных пептидов поддерживали и другие научные группы [42–44]. В частности, Галеотти и соавт. разработали синтез пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов, используя в качестве исходных компонентов тиазолидины пептидов [42]. Гидролиз таких гетероциклов с помощью солей меди проходил в течение нескольких минут с хорошим выходом и без

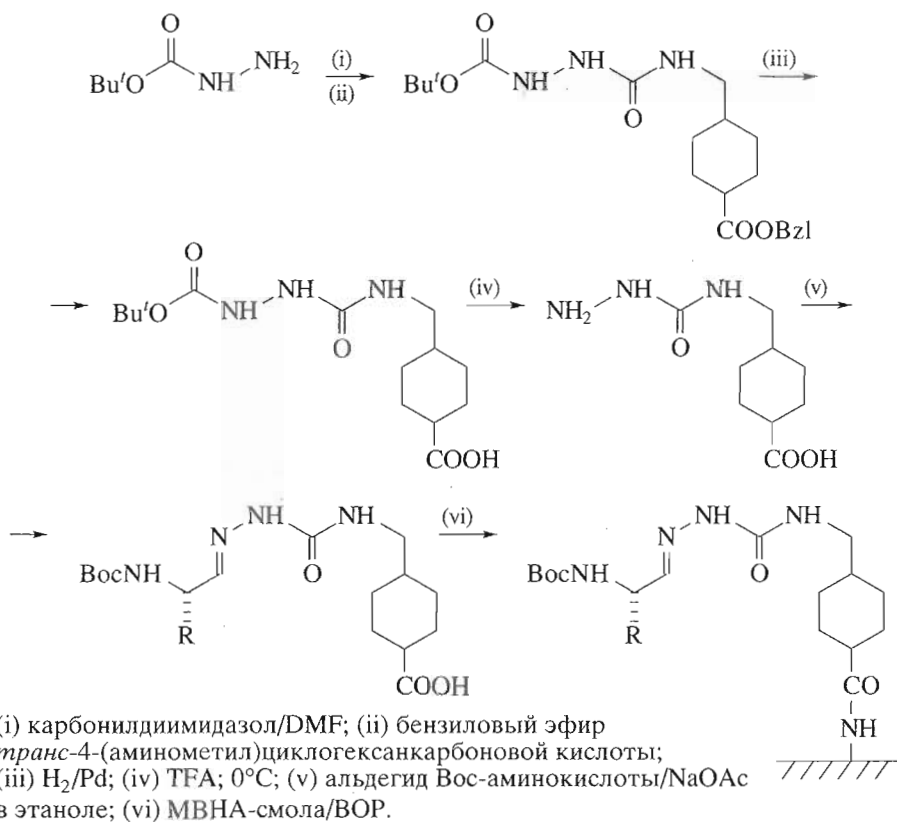


Схема 6. Твердофазный синтез. Схема фиксации первого звена через семикарбазон *N*-ациламиноальдегида [41].



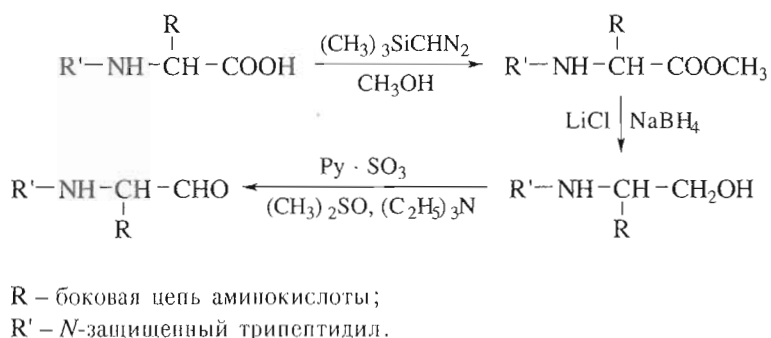


Схема 7. Схема синтеза пептидил-α-аминоальдегидов из метиловых эфиров пептидов [45].

рацемизации. Затем этот же принцип синтеза применяли в твердофазном методе [43].

Таким образом, с помощью твердофазного метода синтеза можно получать оптически чистые пептидальдегиды, однако конечные выходы целевого продукта не превышают 35–40%.

#### 2.4. Получение через модифицированные пептиды или производные пептидов

Как указывалось выше, пептидил-α-аминоальдегиды можно получать окислением пептидил-β-аминоспиртов или восстановлением C-производных пептидов (гидроксаматов, сложных эфиров и т.д.). Так, Хамада и соавт. [45], превращая N-защищенные пептиды в метиловые эфиры при помощи (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCHN<sub>2</sub>, затем без выделения и очистки восстанавливали их боргидридом натрия в присутствии LiCl до соответствующих пептидил-β-аминоспиртов (схема 7). По представленной схеме были получены N-защищенные пентапептидил-β-аминоспирты Вос-Тур-Gly-Gly-Phe-Leuol и Вос-Тур-Gly-Gly-Phe-Metol, которые затем легко окислялись комплексом Py · SO<sub>3</sub> в присутствии диметилсульфоксида и триэтиламина с выходами 61 и 72%, соответственно, до соответствующих альдегидов. Учитывая высокую склонность пептидил-α-аминоальдегидов (подобно α-аминоальдегидам) к рацемизации на силикагеле, очистку продуктов реакции с помощью колоночной хроматографии заменили экстракцией. Полученные модифицированные пептиды были охарактеризованы спектральными методами (<sup>1</sup>H-ЯМР и ИК).

По аналогичной схеме с использованием в качестве окислителя комплекса Py · SO<sub>3</sub> в присутствии диметилсульфоксида и триэтиламина был получен Z-Phe-Metol (выход 94%) [46] и серия пептидилтриптофаналей, которые относятся к сильным селективным ингибиторам катепсина L (выходы 36–69%) [47].

Этими же авторами был предложен альтернативный способ синтеза пептидилтриптофаналей восстановлением N-метокси-N-метилкарбоксамидов

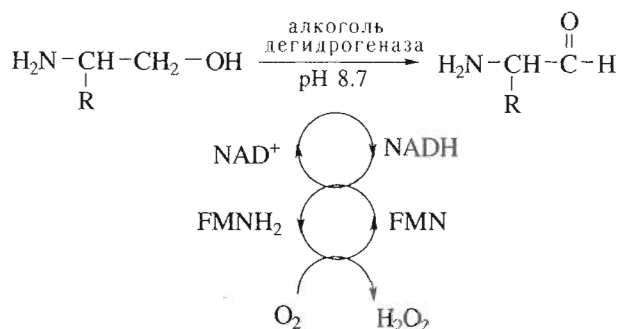
пептидов диизобутилалюмогидридом в THF при –60°C (выходы порядка 80%) [47]. По аналогичной схеме Ференц и соавт. [48] восстанавливали N-метокси-N-метилкарбоксамиды пептидов алюмогидридом лития в диэтиловом эфире при 0 °C с выходами 92–98%.

Танами и соавт. [49] синтезировали модифицированный пептид Ac-Asp(OCH<sub>3</sub>)-Glu(OBzl)-Leuol, относящийся к сильным ингибиторам кальпаина I, папаина и катепсина B *in vitro* и использующийся в медицине для лечения атрофии мышц. В результате взаимодействия H-Leuol с Вос-Glu(OBzl)-ONSu в эфире образовывался Вос-Glu(OBzl)-Leuol, который после удаления Вос-группы 4 M соляной кислотой в диоксане конденсировали с Вос-Asp(OCH<sub>3</sub>)-ONSu в эфире. Полученный Вос-Asp(OCH<sub>3</sub>)-Glu(OBzl)-Leuol вновь деблокировали в тех же условиях, а затем ацилировали укусным ангидридом в смеси пиридин/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Пептидил-β-аминоспирт Ac-Asp(OCH<sub>3</sub>)-Glu(OBzl)-Leuol затем окисляли комплексом Py · SO<sub>3</sub> в присутствии диметилсульфоксида и триэтиламина.

Мягкое окисление пептидов, содержащих на C-конце остаток β-аминоспирта, можно осуществлять диметилсульфоксидом в присутствии карбодиимида. Однако метод характеризуется невысоким выходом альдегидов. Окисление смесью DMSO/DCC было применено при синтезе лейпептинов Pp-LL и Ac-LL [50].

Описан метод окисления пептидил-β-аминоспиртов до соответствующих альдегидов диметилсульфоксидом в присутствии оксалилхлорида [51]. Реакцию проводили в атмосфере азота при –63°C. В результате были получены дипептидил-α-аминоальдегиды общей формулы RNHCHR<sup>1</sup>CONHCHR<sup>2</sup>CHO (R = Z; R<sup>1</sup> = –CH<sub>3</sub>, –CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; R<sup>2</sup> = –CH<sub>3</sub>, –CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, –CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) и трипептидил-α-аминоальдегиды (R = –COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>; R<sup>1</sup> = –CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> = –CH<sub>3</sub>, –CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, –CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), выходы которых составили 80–90%.

Пептидальдегиды, содержащие альдегид глутамина, являются эффективными и селективными



R = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>-; (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-.

**Схема 8.** Схема ферментативного окисления β-аминоспиртов алкогольдегидрогеназой [54].

ингибиторами 3С-протеиназ. Во избежание циклизации боковой цепи глутамина с образованием шестичленного циклического аминаля было предложено синтезировать пептидальдегиды, содержащие остатки глутаминала с защищенной γ-амидной функцией (например, диметиламид глутаминала), или аналоги глутаминала с незаряженной боковой цепью (например, метиловый эфир глутамата) [53]. Пептидальдегиды подобной структуры оказались весьма эффективными ингибиторами пикорнавирусных 3С-протеиназ. Значения  $K_i$  колебались в пределах 10<sup>-7</sup>–10<sup>-9</sup> М. Веббер и соавт. [52] окисляли пептидил-β-аминоспирт Z-Leu-Phe-Gln(Tr)ol о-йодоксибензойной кислотой в безводном диметилсульфоксиде с выходом 93%. Малкольм и соавт. [53] предложили методику восстановления в альдегид тиоэфира (N<sup>ε</sup>-диметил)глутаминала. Тиоэфир (N<sup>ε</sup>-диметил)глутаминала по стандартной методике присоединяли к определенному пептидному фрагменту, и полученный тиоэфир пептида восстанавливали в соответствующий альдегид триэтилсианом в диметилформамиде на палладиевом катализаторе с выходом 74%. Данная методика позволяет достаточно быстро и с высокими выходами синтезировать пептидальдегиды с различными аминокислотными остатками в положениях P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>.

Как упоминалось выше, пептидальдегиды относятся к достаточно нестабильным соединениям, способным окисляться и рацемизоваться при хранении. Представленные здесь методы синтеза позволяют получать оптически стабильные промежуточные соединения, например пептидил-β-аминоспирты, семикарбазоны пептидил-α-аминоальдегидов или тиоэфиры пептидов, которые можно превращать в целевой пептидил-α-аминоальдегид непосредственно перед его использованием.

### 3. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПУТИ СИНТЕЗА ПЕПТИДИЛ-α-АМИНОАЛЬДЕГИДОВ

В настоящее время значительный интерес представляет ферментативный метод образования пептидной связи, который позволяет в мягких условиях синтезировать препараты высокой степени химической и оптической чистоты без применения токсичных конденсирующих агентов и защиты боковых функциональных групп аминокислот. Ферментативные способы синтеза широко применяются при получении пептидов и их производных, однако примеры использования ферментов для синтеза различных производных пептидил-α-аминоальдегидов весьма немногочисленны.

Описано получение α-аминоальдегидов окислением β-аминоспиртов под действием алкогольдегидрогеназы из печени лошади. В результате ферментативного дегидрирования β-аминоспиртов получают α-аминоальдегиды [54]. Специфичности этого фермента соответствуют β-аминоспирты, содержащие неполярные заместители: L-лейцинол, L-фенилаланинол, L-валинол и др. Аминоспирты – аналоги полярных аминокислот (L-аргининол, L-лизинол) ферментом не окисляются. Для достижения полной конверсии аминоспиртов реакцию проводят в присутствии семикарбазида (для связывания образующегося альдегида), NAD<sup>+</sup> и FMN (для регенерирования окисляющего кофермента) (схема 8). Этот мягкий ферментативный метод дает возможность получения семикарбазонов α-аминоальдегидов со свободной аминогруппой, которые можно непосредственно использовать в качестве аминокомпонента в пептидном синтезе. Альдегидную функцию полученных в результате синтеза семикарбазонов α-аминоальдегидов регенерируют, обрабатывая формальдегидом в кислой среде. Этим методом получены оптически активные производные α-аминоальдегидов со сравнительно высокими выходами. Так, в случае дегидрирования L-фенилаланинола выход семикарбазона соответствующего α-аминоальдегида составил 69%.

В 1987 г. Вонг и Вест описали синтез Z-Gly-Glyal(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и Z-L-Pro-Glyal(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ферментативным ацилированием диметилацетата глицинала [55]. В качестве катализатора образования пептидной связи авторы использовали сорбированную липазу из *Candida cylindracea*, реакцию проводили в ацетонитриле. Выходы целевых продуктов в данном случае не превышали 50%. Барбас и Вонг ацилировали этот же ацеталь метиловым эфиром Z-фенилаланина в присутствии тиолзависимой протеиназы папаина. Реакцию проводили в 40% метаноле в карбонатном буфере (pH 9.0) в присутствии 2-меркаптоэтанола. Ацеталь дипептидальдегида Z-Phe-Glyal(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> был получен с выходом 73% [56].

В последние годы показана возможность использования в качестве катализатора синтеза



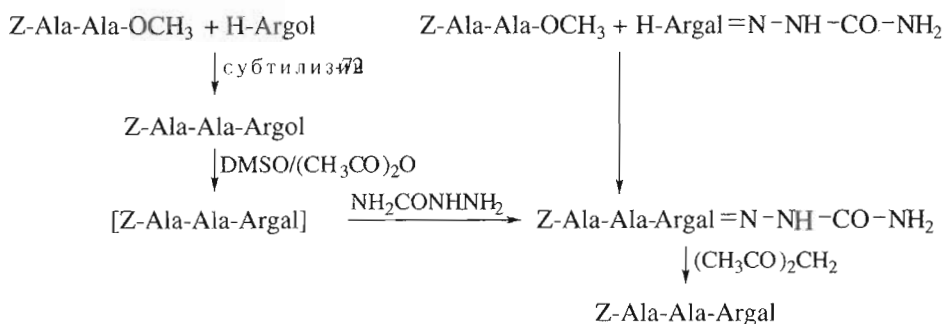


Схема 9. Схема ферментативного синтеза пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов [58].

пептидальдегидов сериновой протеиназы субтилизина-72. Были предложены два возможных биокаталитических пути синтеза этих соединений (схема 9) [57, 58]. В первом случае ферментативно ацилировали аминокислоты, затем полученные пептидил- $\beta$ -аминоспирты химически окисляли мягкими реагентами – диметилсульфоксидом и уксусным ангидридом – до соответствующих пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов. На стадии окисления пептидил- $\beta$ -аминоспиртов в соответствующие пептидил- $\alpha$ -аминоальдегиды выход реакции составлял порядка 70%. Во втором случае ферментативно ацилировали производные  $\alpha$ -аминоальдегидов, предварительно полученные химическими методами.

В обоих случаях в качестве катализатора использовали фермент, сорбированный на макропористом носителе силохроме. Реакции проводили в среде органических растворителей (DMF/ацетонитрил). Выходы практически всех ферментативных реакций синтеза модифицированных пептидов составляли 80–90%. Представленным способом были получены пептиды, имеющие на С-конце альдегиды как гидрофобных [58], так и гидрофильных природных аминокислот [59, 60].

Таким образом, использование аналогов природных аминокислот –  $\beta$ -аминоспиртов и  $\alpha$ -аминоальдегидов с защищенной альдегидной функцией в качестве аминокислотных компонентов при ферментативном синтезе модифицированных пептидов представляет собой новый перспективный путь получения этих соединений.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видно из представленного обзора, в литературе описано немало способов синтеза пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов. Их можно классифицировать следующим образом:

1. Конденсация производных  $\alpha$ -аминоальдегидов и ацилпептидов с последующим высвобождением альдегидной группы [23, 24, 26, 29–34].
2. Окисление пептидил- $\beta$ -аминоспиртов [45–47, 49–52].

3. Восстановление карбоксамидов, пиразолидов, эфиров пептидов [47, 48, 53].

4. Твердофазный метод, основанный на методах синтеза пептидальдегидов в растворе [37–44].

5. Ферментативный метод [54–59].

Все они представляют собой многостадийные процессы и имеют ряд недостатков, основными из которых являются невысокий конечный выход целевого продукта и значительная потеря его оптической чистоты.

Наиболее перспективными для получения оптически чистых пептидальдегидов, по-видимому, следует считать предложенные недавно твердофазные методы синтеза, а также окисление пептидил- $\beta$ -аминоспиртов диметилсульфоксидом, активированным оксалилхлоридом. Однако последний из рассматриваемых способов, наиболее распространенный в настоящее время в органическом синтезе, требует интенсивного охлаждения (температура проведения реакции порядка  $-60^\circ\text{C}$ ), что не всегда удобно при масштабировании процесса. Окисление в более мягких условиях (смесью диметилсульфоксид/карбодимид) и другими активированными диметилсульфоксидами, которые нашли широкое применение в тонком органическом синтезе, как правило, не обеспечивает достаточно хорошего выхода пептидальдегида.

При твердофазном синтезе (несмотря на высокие выходы на каждой стадии) в реакционной среде неизбежно накапливаются пептиды различной длины, что осложняет выделение целевого продукта в конце процесса. Лишь в случае получения ди- и трипептидальдегидов это не представляет серьезной проблемы.

Использование ферментативных методов для получения пептидил- $\alpha$ -аминоальдегидов позволяет упростить общую схему синтеза, исключив стадии блокирования и деблокирования боковых функциональных групп аминокислот, и синтезировать с высоким выходом в мягких условиях оптически чистые препараты без применения ток-

сичных конденсирующих агентов, однако этот метод еще находится в стадии развития.

Суммируя все вышесказанное, можно сделать вывод, что выбор способа синтеза того или иного пептида альдегида в конечном счете зависит от целей и задач, поставленных перед экспериментатором, и определяется свойствами С-концевого альдегида и других аминокислот, входящих в состав целевого соединения.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bajusz S., Szell E., Bagdy D., Barabas E., Horvath G., Dioszegi M., Fittler Z., Szabo G., Juhasz A., Tomori E., Szilagy G. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. P. 1729–1735.
2. Mehdy Sh., Angelastro M.R., Wiseman J.S., Bey Ph. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 157. P. 1117–1123.
3. Livingston D.J. // *J. Cell. Biochem.* 1997. V. 64. P. 19–26.
4. Thompson R.C. // *Biochemistry.* 1973. V. 12. P. 47–51.
5. Sarubbi E., Seneci P.F., Angelastro M.R., Peet N.P., Denaro M., Islam K. // *FEBS.* 1993. V. 319. P. 253–256.
6. Fehrentz J.A., Heitz A., Castro B., Cazaubon C., Nisato D. // *FEBS Lett.* 1984. V. 167. P. 273–276.
7. Basak A., Jean F., Seidah N.G., Lazure C. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1994. V. 44. P. 253–261.
8. Dobson G., Wlodawer A. // *Trends Biochem. Sci.* 1998. V. 23. P. 347–352.
9. Stefanelli C., Bonavita F., Stanic I., Pignatt C., Farrugia G., Masotti L., Guarnieri C., Caldarera C.M. // *Biochem. J.* 1998. V. 332. P. 661–665.
10. Hamazaki H. // *FEBS Lett.* 1998. V. 424. P. 136–138.
11. Bagdy D., Barabas E., Szabo G., Bajusz S., Szell E. // *Thrombosis and Haemostasis.* 1992. V. 67. P. 357–365.
12. Teno N., Wanaka K., Okada Y., Tsuda Y., Okamoto U., Hijikata-Okunomiya A., Naito T., Okamoto S. // *Chem. Pharm. Bull.* 1991. V. 39. P. 2340–2346.
13. Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins J. // *Nature (London).* 1992. V. 356. P. 768–774.
14. Odake S., Kam C.M., Narasimhan L., Poe M., Blake J.T., Krahenbuhl O., Tschopp J., Powers J.C. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 2217–2227.
15. Wellink J., van Kammen A. // *Arch. Virol.* 1988. V. 98. P. 1–26.
16. Scheidt K.A., Roush W.R., McKerrow J.H., Selzer P.M., Hansell E., Rosental P.J. // *Bioorg. Med. Chem.* 1998. V. 6. P. 2477–2494.
17. Albeck A., Persky R., Kliper S. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995. V. 5. P. 1767–1772.
18. Nishikata M., Kasai K., Ishii S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. V. 660. P. 256–261.
19. Someno T., Saino T., Katoh K., Miyazaki H., Ishii S. // *J. Biochem.* 1985. V. 97. P. 1493–1500.
20. Ito A., Takahashi R., Baba J. // *Chem. Pharm. Bull.* 1975. V. 23. P. 3081–3087.
21. Ho P.T., Ngu K.J. // *J. Org. Chem.* 1993. V. 58. P. 2313–2316.
22. Rittle K.E., Homnick C.F., Ponticello G.S., Evans B.E. // *J. Org. Chem.* 1982. V. 47. P. 3016–3018.
23. Maeda K., Umezawa H. // *J. Antibiotics.* 1972. V. 25. P. 515–523.
24. McConnel R.S., York J.L., Frizzel D., Ezzell C. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 1084–1089.
25. Ried W., Pfaender P. // *Liebigs Ann. Chem.* 1961. V. 640. P. 111–126.
26. Masaki T., Tanaka T., Tsunasawa S., Sakiyama F., Soejima M. // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992. V. 56. P. 1604–1607.
27. Модифицированные аминокислоты и пептиды на их основе / Ред. Г.И. Чипенс. Рига: Зинанте, 1987. С. 214.
28. Потетина Ж.В. Стратегия биокаталитического синтеза модифицированных пептидов – ингибиторов протеиназ. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2000. С. 34–42.
29. Umezawa H. // *Methods Enzymol.* 1981. V. 80. P. 842.
30. Yokosawa H., Nishikata M., Ishii S. // *J. Biochem.* 1984. V. 95. P. 1819–1821.
31. McConnell R.S., Barnes G.E., Hoynig C.F., Gunn J.M. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. P. 86–93.
32. Ito A., Takahashi R., Miura Ch., Baba Y. // *Chem. Pharm. Bull.* 1973. V. 22. P. 3106–3113.
33. Someno T., Ishii S. // *Chem. Pharm. Bull.* 1986. V. 34. P. 1748–1754.
34. Chapman K.T. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1992. V. 2. P. 613–618.
35. Balasubramanian N., Laurent D.R. Peptide Aldehydes as Antithrombotic Agents. // *Eur. Pat. Appl. Ep.* 256877. 1993. V. 5.
36. Shuman P.T., Rothenberger R.B., Campbell C.S., Smith G.F., Gifford-Moore D.S., Gesellchen P.D. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 314–319.
37. Fehrentz J.A., Paris M., Heitz A., Velek J., Liu C.F., Winternitz F., Martinez J. // *Tetrahedron Lett.* 1995. V. 36. P. 7871–7874.
38. Fehrentz J.A., Paris M., Heitz A., Velek J., Winternitz F., Martinez J. // *J. Org. Chem.* 1997. V. 62. P. 6792–6796.
39. Pothion C., Paris M., Heitz A., Rocheblave L., Rouch F., Fehrentz J.A., Martinez J. // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 38. P. 7749–7752.
40. Hall B.J., Sutherland J.D. // *Tetrahedron Lett.* 1998. V. 39. P. 6593–6596.
41. Murphy A.M., Dagnino R., Pureza I.R., Vallar L., Trippe A.I., Sherman Sh.L., Lumpkin R.M., Tamura S.Y., Webb Th.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 3156–3157.
42. Galleotti N., Plagnes E., Jouin P. // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 38. P. 2459–2462.
43. Galleotti N., Giraud M., Jouin P. // *Let. Pept. Sci.* 1997. V. 4. P. 437–440.
44. Ede N.J., Bray A.M. // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 38. P. 7119–7122.
45. Hamada Y., Shioiri T. // *Chem. Pharm. Bull.* 1982. V. 30. P. 1921–1924.
46. Shepherd T.A., Cox G.A., McKinney E., Tang J., Wakulchik M., Zimmerman R.E., Villarreal E.C. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996. V. 6. P. 2893–2896.

47. Yasuma T., Oi S., Choh N., Nomura T., Furuyama N., Nishimura A., Fujisawa Y., Sohda T. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 4301–4308.
48. Fehrentz J.-Al., Heitz A., Castro B. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1985. V. 26. P. 236–241.
49. Tanami T., Yokoo C., Hatayama K. Preparation of Tripeptide Aldehyde Derivatives as Cysteine Protease Inhibitors. // *Jpn. Hokai Tokkyo K. Jp.* 03258800. 1991.
50. Kawamura K., Kondo S., Maeda K., Umezawa H. // *Chem Pharm. Bull.* 1969. V. 17. P. 1902–1907.
51. Reetz M.T., Griebenow N. // *Liebigs Ann. Chem.* 1996. V. 3. P. 335–348.
52. Webber S.E., Okano K., Little T.L., Reich S.H., Xin Y., Fuhrman S.A., Matthews D.A., Love R.A., Hendrickson T.F., Patick A.K., Meador III J.W., Ferre R.A., Brown E.L., Ford C.E., Binford S.L., Worland S.T. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 2786–2805.
53. Malcolm B.A., Lowe C., Shechosky S., McKay R.T., Yang C.C., Shah V.J., Simon R.J., Vederas J.C., Santi D.V. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 8172–8179.
54. Dahl K.H., Dunn M.F. // *Biochemistry.* 1984. V. 23. P. 4094–4100.
55. West J.B., Wong C.-H. // *Tetrahedron Lett.* 1987. V. 28. P. 1629–1632.
56. Barbas C.F., Wong C.-H. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987. V. 8. P. 533–534.
57. Potetinova J.V., Voyushina T.L., Stepanov V.M. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997. V. 7. P. 705–710.
58. Voyushina T.L., Potetinova J.V., Milgotina E.I., Stepanov V.M. // *Bioorg. Med. Chem.* 2000. V. 7. P. 2953–2959.
59. Potetinova J.V., Makarov V.A., Voyushina T.L. // *Proceedings of the 26th European Peptide Symposium.* Montpellier. France. 2000 (in press).
60. Milgotina E.I., Voyushina T.L. // *Proceedings of the 26th European Peptide Symposium.* Montpellier. France. 2000 (in press).

## Synthesis of Modified Peptides with C-Terminal $\alpha$ -Amino Aldehydes

J. V. Potetinova\*, E. I. Milgotina\*, V. A. Makarov\*\*, and T. L. Voyushina\*

e-mail: potetinov@hotmail.com.

\*Stepanov Laboratory of Protein Chemistry, Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Pervyi Dorozhnyi pr. 1, Moscow, 113545 Russia

\*\*Laboratory of Pharmacology and Pathology of Hemostasis, Hematology Research Center, Moscow, 125167 Russia

Various synthetic approaches to modified peptides with the C-terminal aldehyde group, capable of inhibiting a number of proteolytic enzymes belonging to the classes of thiol, serine, and aspartyl proteases, are considered. Both chemical methods, including solid phase peptide synthesis now widely used, and biocatalytic synthetic methods for obtaining these substances are discussed in detail. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* peptide aldehydes, chemical synthesis, enzyme synthesis, protease inhibitors