

СИНТЕЗ НОВЫХ ФОСФОНОПЕПТИДОМИМЕТИКОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕРДЦА

Э.Р.Абдурахманова, Н.А.Дорофеева*, О.И.Лукашук, А.В.Головченко, В.С.Броварец

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
02660, Киев-94, ул. Мурманская, 1. E-mail: brovarets@bpci.kiev.ua

*Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины

Ключевые слова: сердце; сократимость; 4-фосфорилированные 5-амино-1,3-оксазолы; фосфонопептидомиметики; аминокспирты

Представлен синтез новых фосфорилированных пептидомиметиков, и впервые проведена оценка биологической активности синтезированных соединений на экспериментальных животных – крысах-самцах. Так, на основе диэтилового эфира 1-бензоиламино-2,2,2-трихлорэтилфосфоновой кислоты синтезировано новое производное диэтилового эфира 2-фенил-1,3-оксазол-4-илфосфоновой кислоты, содержащее в положении 5 оксазольного кольца остаток метиламиноэтан-1-ола. Найдены оптимальные условия расщепления 1,3-оксазольного цикла в кислой среде с образованием фосфорилированных пептидомиметиков. Так, при обработке его 85% водной трифторуксусной кислотой был получен диэтиловый эфир {бензоиламино[(2-гидроксиэтил)метилкарбамоил]метил}фосфоновой кислоты, а действие хлористого водорода в безводных условиях дает диэтиловый эфир {бензоиламино[(2-хлорэтил)метилкарбамоил]метил}фосфоновой кислоты. Разработанный метод синтеза является удобным и препаративным, так как превращение происходит в мягких условиях, что позволяет избежать образования побочных продуктов. При этом пептидомиметики выделены с высокими выходами без применения хроматографических колонок. Регистрация различных функциональных показателей кардиогемодинамики проводилась у крыс *in vivo* с помощью микрокатетера и Millar Pressure-Volume System. Исследование влияния полученных соединений на функциональное состояние сердца показало, что их введение крысам внутривенно приводит к снижению частоты сердечных сокращений и стимуляции сократительной активности миокарда.

THE SYNTHESIS OF NEW PHOSPHONOPEPTIDOMIMETICS AND THEIR EFFECT ON THE FUNCTIONAL CARDIAC OUTPUT

E.R.Abdurakhmanova, N.O.Dorofeyeva, O.I.Lukashuk, O.V.Holovchenko, V.S.Brovarets

Key words: heart; contractility; 4-phosphorylated 5-amino-1,3-oxazoles; phosphonopeptidomimetics; amino alcohols
The article presents the synthesis of new phosphorylated peptidomimetics, and the biological activity of the compounds synthesized has been assessed for the first time on the experimental animals – male rats. On the basis of a diethyl ester of 1-benzoylamino-2,2,2-trichloroethylphosphonic acids a novel derivative of 1,3-oxazol-4-phosphonic acid diethyl ester containing the residue of methylaminoethan-1-ol in position 5 of the oxazole ring has been synthesized. The optimal conditions for cleavage of the 1,3-oxazole ring in the acidic medium with formation of phosphorylated peptidomimetics have been found. Thus, when treating it with 85 % aqueous trifluoroacetic acid a diethyl ester of {benzoylamino[(2-hydroxyethyl)carbamoyl]methyl} phosphonic acid has been obtained, and the action of hydrogen chloride under anhydrous conditions gives a diethyl ester of {benzoylamino[(2-chloroethyl)carbamoyl]methyl} phosphonic acid. The method developed is very convenient and preparative because reactions proceed in mild conditions without formation of undesirable by-products. Moreover, peptidomimetics are isolated with high yields, and their isolation does not require chromatography. Monitoring of different functional parameters of cardiac hemodynamics was performed in rats *in vivo* using a microcatheter and the Millar Pressure-Volume System. The study of the effect of the compounds obtained on the cardiac output has shown that their intraperitoneal introduction results in the heart rate decrease and stimulation of the contractile activity of the myocardium.

СИНТЕЗ НОВИХ ФОСФОНОПЕПТИДОМІМЕТИКІВ ТА ЇХ ВПЛИВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СЕРЦЯ

Е.Р.Абдурахманова, Н.О.Дорофеева, О.І.Лукашук, О.В.Головченко, В.С.Броварец

Ключові слова: серце; скоротливість; 4-фосфорильовані 5-аміно-1,3-оксазоли; фосфонопептидоміметици; аміноспирти

Представлений синтез нових фосфорильованих пептидоміметиків, та вперше проведена оцінка біологічної активності синтезованих сполук на експериментальних тваринах – щурах-самцях. На основі діетилового естеру 1-бензоїламіно-2,2,2-трихлороетилфосфонової кислоти синтезовано нове похідне діетилового естеру 2-феніл-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти, що містить у положенні 5 оксазольного кільця залишок метиламіноетан-1-олу. Знайдені оптимальні умови розкриття 1,3-оксазольного циклу в кислому середовищі з утворенням фосфорильованих пептидоміметиків. Так, при обробці його 85% водною трифторооцтовою кислотою був отриманий діетиловий естер {бензоїламіно[(2-гідроксіетил)метилкарбамоїл]метил}фосфонової кислоти, а дія хлористого водню в безводних умовах дає діетиловий естер {бензоїламіно[(2-хлороетил)метилкарбамоїл]метил}фосфонової кислоти. Розроблений метод синтезу є зручним та препаративним, оскільки перетворення проходять у м'яких умовах, що дозволяє уникнути утворення побічних продуктів. При цьому пептидоміметици отримані з високими виходами без застосування хроматографічних колонок. Реєстрація різних функціональних показників кардіогемодинаміки проводилася у щурів *in vivo* за допомогою мікрокатетера і Millar Pressure-Volume System. Дослідження впливу отриманих сполук на функціональний стан серця показало, що їх введення щурам внутривенно приводить до зниження частоти серцевих скорочень і стимуляції скоротливої активності міокарда.

По данным ВОЗ сердечнососудистые заболевания являются основной причиной смертности в Украине и во всем мире [1]. Поэтому актуальной задачей является поиск новых биологически активных веществ, обладающих выраженным действием на сосуды и сердце, способствующих снижению артериального давления, коррекции нарушений сократительной активности миокарда, насосной и диастолической функции сердца.

Известно, что вещества пептидной природы проявляют разнообразную биологическую активность и играют важную роль в процессах жизнедеятельности живых организмов. Наиболее выраженную биологическую активность имеют пептиды с небольшой молекулярной массой [2]. Поэтому возникает значительный интерес к синтезу и модификации таких соединений различными фармакофорными фрагментами. Особое внимание привлекает введение в пептидную цепь фосфорильных групп, а также остатков аминспиртов, поскольку среди такого типа соединений найдены эффективные ингибиторы ферментов [3-6], а также препараты с противоопухолевой активностью [7, 8]. Однако влияние подобных соединений на сократительную активность миокарда, насосную и диастолическую функции сердца не изучались. Поэтому целью данной работы был синтез новых фосфонопептидомиметиков и изучение их влияния на функциональное состояние сердца.

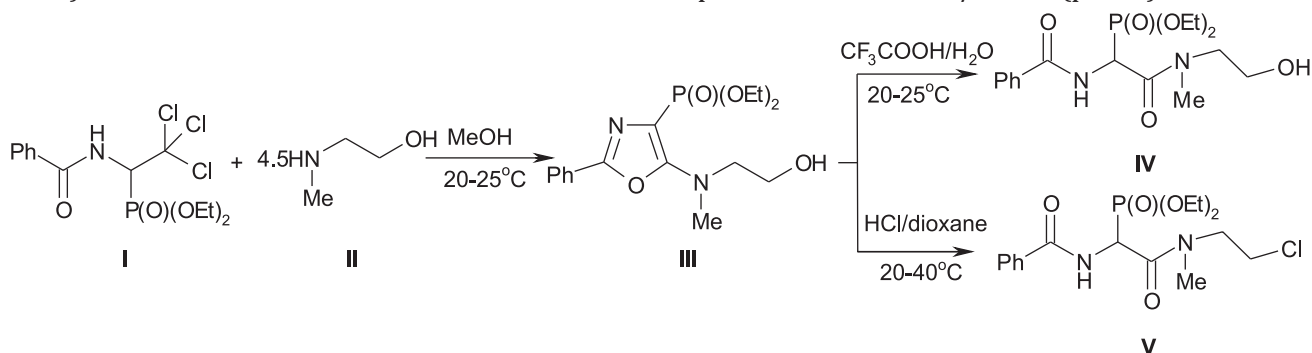
Ранее [9-11] нами было показано, что одним из перспективных методов получения фосфорилированных пептидомиметиков является кислотное расщепление 5-амино-1,3-оксазольного цикла. С целью введения в фосфонопептидную цепь этанольного фрагмента нами получен диэтиловый эфир {5-[(2-гидроксиэтил)метиламино]-2-фенил-1,3-оксазол-4-ил}фосфоновой кислоты (III) из диэтилового эфира 1-бензоиламино-2,2,2-трихлорэтилфосфоновой кислоты (I) [12] и 2-метиламиноэтан-1-ола (II). При обработке соединения (III) 85% водной трифторуксусной кислотой образуется ожидаемый пептидомиметик – диэтиловый эфир {бензоиламино[(2-гидроксиэтил)метилкарбамоил]метил}фосфоновой кислоты (IV) с выходом 57% (схема).

Интересным оказалось поведение оксазола (III) в присутствии хлористого водорода в безводных условиях. При этом происходит не только раскрытие 1,3-оксазольного цикла, но и замена гидроксильной группы на атом хлора, в результате чего получен диэтиловый эфир {бензоиламино[(2-хлорэтил)метилкарбамоил]метил}фосфоновой кислоты (V). Следует отметить, что соединение (V) по своей структуре напоминает известный противоопухолевый препарат фотемустин [13], который в настоящее время успешно применяется при злокачественных опухолях головного мозга и диссеминированной меланоме, что еще раз подтверждает актуальность исследования биологической активности данного класса соединений.

Состав и строение веществ (III-V) согласуются с данными элементного анализа, ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Результаты тестирования полученных соединений на показатели кардиогемодинамики крыс показали, что диэтиловый эфир фосфоновой кислоты (III) снижает конечно-систолическое давление (КСД) на 11%, при этом конечно-диастолическое давление (КДД) достоверно не изменялось. В то же время пептидомиметик (V) не оказывал влияния на КСД и КДД. Однако, соединения (III) и (V) снижали частоту сердечных сокращений (ЧСС) на 12% и 5,6%, соответственно (рис. 1). При этом снижение частоты сердечных сокращений приводило к снижению минутного объема крови (МОК) на 22,4% для 5-амино-1,3-оксазола (III), а соединение (V) достоверно не изменяло МОК. Ударный объем сердца и фракция выброса (количество крови, выбрасываемое левым желудочком в аорту за 1 мин, то есть произведение УО на ЧСС) после введения крысам веществ (III) и (V) достоверно не изменялись.

Следует отметить, что введение в организм крыс диэтиловых эфиров фосфоновой кислоты (III) и (V) приводило к стимуляции сократительной активности миокарда. Так, в случае соединения (III) максимальная скорость нарастания давления левого желудочка (dP/dtmax) увеличилась на 18,6% (P<0,05), тогда как вещество (V) достоверно не изменяло dP/dtmax (рис. 2).



Схема

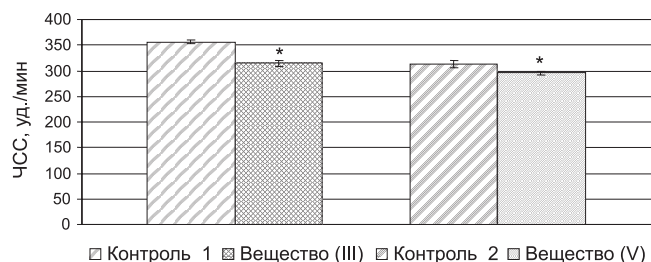


Рис. 1. Частота сердечных сокращений до и после введения диэтиловых эфиров фосфоновой кислоты (III) и (V).

* $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

На показатели расслабимости левого желудочка, максимальную скорость падения давления (dP/dt_{min}) соединения (III) и (V) не оказывали достоверного влияния.

Экспериментальная биологическая часть

Исследование проводилось на экспериментальных животных – крысах-самцах (6 месяцев) линии Вистар. Все экспериментальные процедуры выполнены в соответствии с Европейской Директивой Совета Общин от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЕС). Крыс анестезировали с помощью уретана (1,25 г/кг, внутривенно). Регистрация функциональных показателей кардиогемодинамики у крыс *in vivo* проводилась с помощью микрокатетера и Millar Pressure-Volume System [14]. Регистрировали показатели кардиогемодинамики: конечно-систолическое давление (КСД), конечно-диастолическое давление (КДД), максимальную скорость нарастания давления (dP/dt_{max}), максимальную скорость падения давления (dP/dt_{min}), конечно-систолический объем (КСО), конечно-диастолический объем (КДО), ударный объем (УО), фракцию выброса (ФВ), частоту сердечных сокращений (ЧСС), минутный объем крови (МОК). Диэтиловый эфир {5-[(2-гидроксиэтил)метиламино]-2-фенил-1,3-оксазол-4-ил}фосфоновой кислоты (III) и диэтиловый эфир {бензоиламино[(2-хлорэтил)метилкарбамоил]метил}фосфоновой кислоты (V) вводили внутривенно (3 мг/кг в 1 мл водного 0,9% раствора NaCl).

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры веществ регистрировали на спектрометре Vertex 70 в тонком слое или в таблетках с KBr. Спектры ЯМР (ДМСО- d_6) получены на приборе Bruker AVANCE DRX-500: 1H (500 МГц) и ^{13}C (125 МГц) относительно ТМС (внутренний стандарт), а ^{31}P (202 МГц) относительно 85%-ной фосфорной кислоты (внешний стандарт). Элементный анализ проведен в аналитической лаборатории Института биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины. Температуры плавления измеряли на приборе Fisher-Johns. Контроль за ходом реакции и чистотой синтезированных соеди-

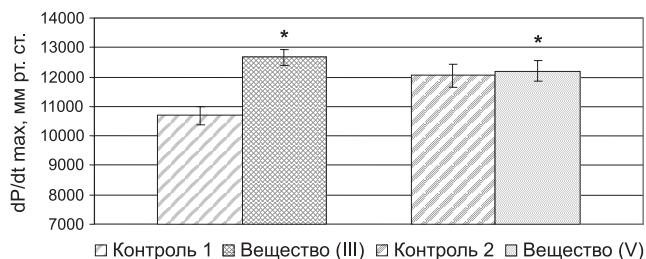


Рис. 2. Максимальная скорость нарастания давления левого желудочка до и после введения диэтиловых эфиров фосфоновой кислоты (III) и (V).

* $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

нений осуществляли методом ТСХ на пластинах Silufol UV-254 (дихлорметан-метанол, 98:2), проявитель – УФ-облучение.

Диэтиловый эфир 1-бензоиламино-2,2,2-трихлорэтилфосфоновой кислоты (I) синтезирован по методике [12].

Диэтиловый эфир {5-[(2-гидроксиэтил)метил-амино]-2-фенил-1,3-оксазол-4-ил}фосфоновой кислоты (III). К раствору 3,88 г (0,01 Моль) соединения (I) в 50 мл метанола добавляли 3,37 г (0,045 Моль) 2-метиламиноэтан-1-ола, смесь перемешивали 48 ч при 18-25°C. Растворитель удаляли в вакууме, остаток обрабатывали дистиллированной водой, а затем экстрагировали трет-бутилметиловым эфиром, растворитель удаляли в вакууме и продукт (III) анализировали без дополнительной очистки. Выход – 78%, бесцветный порошок. Т. пл. – 51-53°C. ИК-спектр (KBr), ν , cm^{-1} : 3372, 1604, 1584, 1227, 1016, 960. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 7.82 д (2H, $^3J_{HH}$ 7.1 Гц, $CH_{аром.}$), 7.51-7.40 м (3H, $CH_{аром.}$), 4.82 уш.с (1H, OH), 4.08-3.99 м (4H, $2OCH_2CH_3$), 3.67-3.60 м (4H, OCH_2CH_2N), 3.22 с (3H, NCH_3), 1.29-1.23 т (6H, $^3J_{HH}$ 7.1 Гц, $2OCH_2CH_3$). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 162.22 д ($C^5_{окс}$, $^2J_{PC}$ 37.4 Гц), 149.63 д ($C^2_{окс}$, $^3J_{PC}$ 22.4 Гц), 129.53, 129.06, 126.60, 124.86 (C_6H_5), 98.67 д ($C^4_{окс}$, J_{PC} 254.8 Гц), 61.87 д ($POCH_2CH_3$, $^2J_{PC}$ 6.0 Гц), 58.69 (CH_2OH), 54.40 и 38.36 (N-C), 16.16 д ($POCH_2CH_3$, $^3J_{PC}$ 6.5 Гц). Спектр ЯМР ^{31}P , δ , м.д.: 13.49. Найдено, %: C 54.23; H 6.54; N 7.91; P 8.74. $C_{16}H_{23}N_2O_5P$. Вычислено, %: C 54.48; H 6.29; N 7.58; P 8.66.

Диэтиловый эфир {бензоиламино[(2-гидроксиэтил)метилкарбамоил]метил}фосфоновой кислоты (IV). Раствор 0,5 г (0,0015 Моль) 4-фосфорилированного 5-амино-1,3-оксазола (III) в 25 мл 85% водной трифторуксусной кислоты перемешивали при 20-25°C 7 ч. Трифторуксусную кислоту удаляли в вакууме, остаток промывали дистиллированной водой. Соединение (IV) очищали на хроматографической колонке (с градиентом элюента дихлорметан-метанол, 98:2, 95:5, 90:10). Выход – 57%, бесцветное масло, которое через 30 сут. кристаллизуется. Т. пл. – 90-92°C. ИК-спектр (KBr), ν , cm^{-1} : 3250, 1671, 1534, 1243, 1017, 983. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 9.26 д (1H, $^3J_{HH}$ 8.0 Гц, NH), 9.01 уш.с (1H, OH), 7.92 д (2H, $^3J_{HH}$ 7.1 Гц, $CH_{аром.}$),

7.57 т (1H, $^3J_{\text{HH}}$ 7.7 Гц, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.52-7.46 м (2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 5.51 дд (1H, $^3J_{\text{HH}}$ 8.8 Гц, $^2J_{\text{PC}}$ 23.3 Гц, СНР), 4.59-4.47 м (1H, СН), 4.40-4.31 м (1H, СН), 4.19-4.05 м (4H, $2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 3.31-3.22 м (2H, NCH_2), 2.63 с (3H, NCH_3), 1.25 т (3H, $^3J_{\text{HH}}$ 6.9 Гц, OCH_2CH_3), 1.19 т (3H, $^3J_{\text{HH}}$ 6.9 Гц, OCH_2CH_3). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 166.65 д (C=O, $^2J_{\text{PC}}$ 5.0 Гц), 166.40 д (C=O, $^3J_{\text{PC}}$ 3.5 Гц), 133.27, 131.91, 128.41, 127.88 (C_6H_5), 63.36 д (POCH_2CH_3 , $^2J_{\text{PC}}$ 7.0 Гц), 63.22 д (POCH_2CH_3 , $^2J_{\text{PC}}$ 7.0 Гц), 60.94 (OCH_2), 51.08 д (PCN , J_{PC} 149.1 Гц), 46.71 (NCH_3), 32.59 (NCH_2), 16.26 д (POCH_2CH_3 , $^3J_{\text{PC}}$ 5.0 Гц). Спектр ЯМР ^{31}P , δ , м.д.: 16.88. Найдено, %: С 51.61; Н 6.77; N 7.52; P 8.32. $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$. Вычислено, %: С 51.33; Н 6.33; N 7.25; P 8.25.

Диэтиловый эфир {бензоиламино[(2-хлор-этил)метилкарбамоил]метил}фосфоновой кислоты (V). Раствор 0,5 г (0,0015 Моль) 5-амино-1,3-оксазола (III) в 25 мл безводного диоксана насыщали сухим хлороводородом. Смесь перемешивали при 20-25°C 3 ч. Растворитель удаляли в вакууме. Соединение (V) анализировали без дополнительной очистки. Выход – 85%, бесцветное масло. ИК-спектр (тонкий слой), ν , cm^{-1} : 1644, 1523, 1243, 1014, 970. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 7.82 д (2H, $^3J_{\text{HH}}$ 7.4 Гц, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.56-7.41 м (3H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.32-7.25 м (1H, NH), 5.79 дд (1/3H, $^3J_{\text{HH}}$ 8.8 Гц, $^2J_{\text{PH}}$ 17.8 Гц, СНР), 5.72 дд (2/3H, $^3J_{\text{HH}}$ 8.8 Гц, $^2J_{\text{PH}}$ 17.8 Гц, СНР), 4.29-4.13 м (4H, $2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 3.82-3.63 м (4H, 2CH_2), 3.36 с (2H,

NCH_3), 3.06 с (1H, NCH_3), 1.38-1.28 м (6H, $2\text{OCH}_2\text{CH}_3$). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 166.07, 166.03, 165.99, 165.87 (C=O), 132.98, 131.66, 128.28, 126.84 (C_6H_5), 63.49 д (POCH_2CH_3 , $^2J_{\text{PC}}$ 6.0 Гц), 63.28 д (POCH_2CH_3 , $^2J_{\text{PC}}$ 6.0 Гц), 51.19, 50.87 (CH_2Cl), 48.10 д (PCN , J_{PC} 146.6 Гц), 47.96 д (PCN , J_{PC} 146.6 Гц), 40.55, 40.42, 37.44, 34.38 (NCH_3), 16.08 д (POCH_2CH_3 , $^3J_{\text{PC}}$ 5.5 Гц), 15.96 д (POCH_2CH_3 , $^3J_{\text{PC}}$ 5.5 Гц). Спектр ЯМР ^{31}P , δ , м.д.: 16.93, 16.83. Найдено, %: С 49.17; Н 6.19; N 7.17; P 7.93; Cl 9.07. $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{P}$. Вычислено, %: С 49.00; Н 6.33; N 7.25; P 7.90.

Выводы

1. Показано, что при взаимодействии диэтилового эфира 1-ациламино-2,2,2-трихлорэтилфосфоновой кислоты с 2-метиламиноэтан-1-олом образуется неизвестный ранее диэтиловый эфир {5-[(2-гидроксиэтил)метиламино]-2-фенил-1,3-оксазол-4-ил}фосфоновой кислоты, который был использован для получения новых фосфорилированных пептидомиметиков.

2. Биологические исследования полученных соединений указывают на то, что данные вещества могут быть использованы для коррекции нарушений сократительной активности миокарда функционального состояния сердца при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Литература

1. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva, World Health Organization, 2014.
2. Hughes A. B. Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2009, pp.189.
3. Umezawa H., Aoyagi T., Suda H., Hamada M. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase b, produced by actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 1976, Vol. 29, pp.97-99.
4. Suda H., Takita T., Aoyagi T., Umezawa H. The structure of bestatin. *The Journal of Antibiotics*, 1976, Vol. 29, pp.100-101.
5. Nakamura H., Suda H., Takita T., Aoyagi T., Umezawa H. X-ray structure determination of (2S, 3R) -3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid, a new amino acid component of bestatin. *The Journal of Antibiotics*, 1976, Vol. 29, pp.102-103. doi:10.7164/antibiotics.29.102.
6. Pearson W. H., Hines J. V. Synthesis of beta-amino-alpha-hydroxy acids via aldol condensation of a chiral glycolate enolate. A synthesis of bestatin. *The Journal of Organic Chemistry*, 1989, Vol. 54, pp.4235-4237. doi:10.1021/jo00278a050.
7. Guenard D., Gueritte-Voegelein F., Potier P. Taxol and taxotere: discovery, chemistry, and structure-activity relationships. *Accounts of Chemical Research*, 1993, Vol. 26, pp.160-167. doi:10.1021/ar00028a005.
8. Kingston D. G. Taxol, a molecule for all seasons. *Chemical Communications*, 2001, pp.867-880. doi:10.1039/B100070P.
9. Lukashuk O. I., Abdurakhmanova E. R., Kondratyuk K. M., Golovchenko O. V., Khokhlov K. V., Brovarets V. S., Kukhar V. P. Introduction of chiral 2-(aminoalkyl) substituents into 5-amino-1,3-oxazol-4-ylphosphonic acid derivatives and their use in phosphonodipeptide synthesis. *RSC Advances*, 2015, Vol. 5, pp.11198-11206. doi: 10.1039/C4RA13819H.
10. Kondratyuk K., Lukashuk O., Golovchenko A., Komarov I., Brovarets V., Kukhar V. Synthesis of 5-amino-2-aminoalkyl-1,3-oxazol-4-ylphosphonic acid derivatives and their use in the preparation of phosphorylated peptidomimetics. *Tetrahedron*, 2013, Vol. 69, pp.6251-6261. doi:10.1016/j.tet.2013.05.017.
11. Lukashuk O., Kondratyuk K., Golovchenko A., Brovarets V., Kukhar V. A Novel Synthetic Approach to Phosphorylated Peptidomimetics. *Heteroatom Chemistry*, 2013, Vol. 24, pp.289-297. doi: 10.1002/hc.21093.
12. Drach B. S., Sviridov E. P. *Zhurnal obshchey khimii*, 1974, Vol. 2, No.44, pp.348-352.
13. Kobayakov G. L. *Farmateka*, 2003, Vol. 14, pp.11-18.
14. Dorofeieva N. O., Kuzmenko M. O., Sahach V. F. *Fiziologichnyi zhurnal*, 2012, No.4, pp.44-51.

Надійшла до редакції 22.02.2016 р.