

УДК 542.91:547.466.2:547.241

СИНТЕЗ ФОСФИНОВОГО АНАЛОГА АЛАНИЛЛЕЙЦИНА

© 2020 г. С. Р. Головаш^а, О. С. Григоркевич^б, Г. С. Цебрикова^с,
М. Э. Дмитриев^а, В. В. Рагулин^{а,*}

^а Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,
Северный проезд 1, Черноголовка, 142432 Россия

^б Научно-исследовательский институт фармакологии имени В. В. Закусова Российской академии наук,
Москва, 125315 Россия

^с Институт физической химии и электрохимии имени А. Н. Фрумкина Российской академии наук,
Москва, 119071 Россия
*e-mail: rvalery@dio.ru

Поступило в Редакцию 27 сентября 2019 г.
После доработки 27 сентября 2019 г.
Принято к печати 5 октября 2019 г.

Исследованы реакции амидоалкилирования фосфонистой кислоты, содержащей структурный изостер лейцина, в ацетилхлориде и(или) уксусном ангидриде в условиях кислого катализа. Предложен двух-компонентный метод синтеза фосфинового аналога аланиллейцина с использованием этилиденбис(бензилкарбамата).

Ключевые слова: псевдоаланиллейцин, матриксные металлопротеиназы (ММП), ингибиторы цинк-металлопротеиназ, амидоалкилирование, фосфиновые структурные изостеры

DOI: 10.31857/S0044460X2004-228

Фосфиновые структурные аналоги природных пептидов входят в качестве лигандных составляющих в состав перспективных радиофармпрепаратов [1], а также являются ингибиторами матриксных металлопротеиназ (ММП), представляющих собой семейство цинк-содержащих эндопротеаз, вовлеченных в разнообразные биологические процессы [2, 3]. Металлопротеиназы 2 и 9 типов (ММП-2 и ММП-9), называемые желатиназами, играют важную роль в постинфарктном ремоделировании миокарда [4]. Нежелательную активность желатиназ, проявляющуюся в отрицательном воздействии на ткани сердечно-сосудистой системы, можно снизить или исключить с помощью ингибиторов, содержащих цинк-хелатирующую группу [5, 6]. Эффективными ингибиторами цинк-металлопротеиназ являются фосфиновые псевдопептиды – структурные изостеры пептидов, в молекуле

которых две аминокислотные компоненты дипептида связаны цинк-хелатирующим фосфиновым фрагментом [2, 7]. При этом метиленфосфорильный $\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})$ фрагмент имитирует природную пептидную связь с тетракоординированным атомом углерода в переходном состоянии пептидного гидролиза (схема 1).

Широко используемым подходом к фосфиновой модификации пептидной связи является син-

Схема 1.

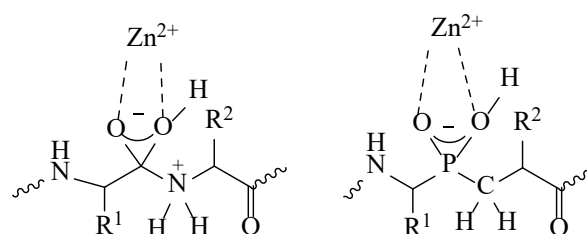
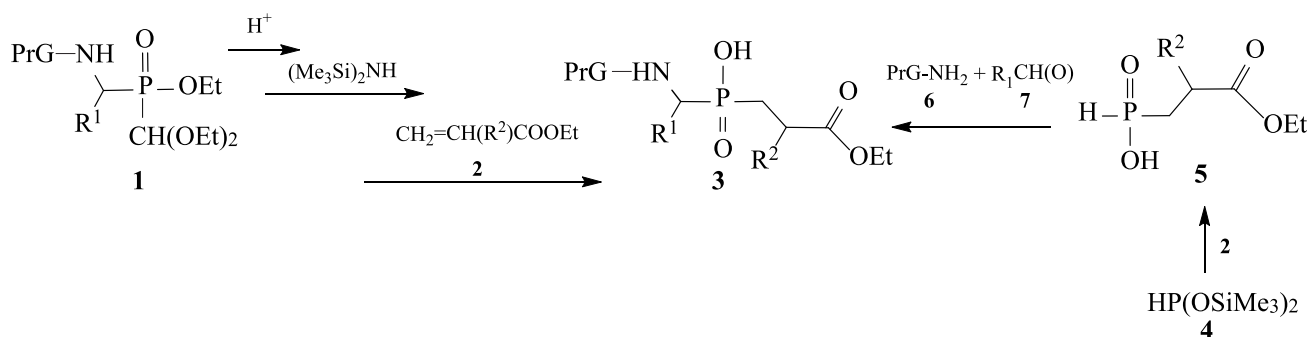


Схема 2.



тез N,P-защищенного производного **1**, фосфонистого изомера соответствующей аминокислоты, разработанный компанией «Ciba-Geigy» [8, 9] с последующим его превращением в силиловый эфир P^{III}-фосфонистого аналога аминокислоты и присоединением к соответствующим α-замещенным акрилатам **2** (схема 2) [2, 7].

Нами разработан более короткий способ синтеза с обратным построением искомой молекулы псевдопептида **3**, который заключается в первоначальном присоединении генерированного *in situ* гипофосфита **4** к соответствующим образом α-R²-замещенным акрилатам **2** с образованием фосфонистых кислот **5**, содержащих структурный изостерный фрагмент соответствующей аминокислоты, которую определяет соответствующий заместитель (R²) в α-положении акриловой системы [10–13]. Амидоалкилирование фосфонистых кислот **5** с использованием алкилкарбаматов **6** и соответствующих карбонильных соединений **7** приводит к целевым псевдопептидам **3** (схема 2) [11–13].

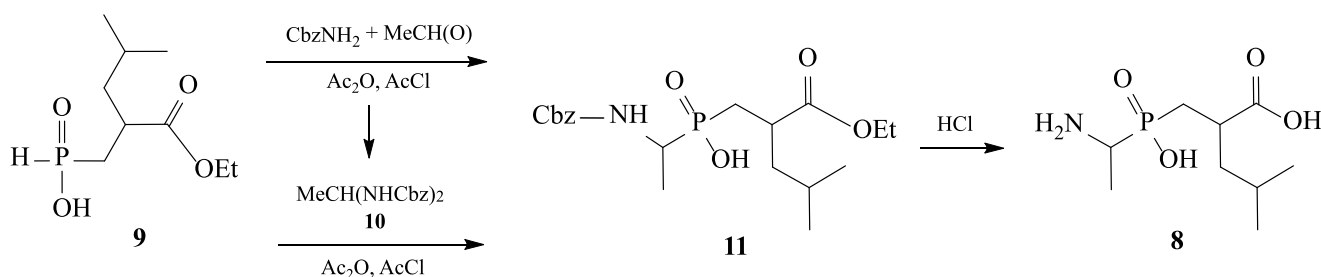
Данная работа является дальнейшим развитием предложенной ранее методологии синтеза фосфоизостеров пептидов из гипофосфитов [10–13] и посвящена синтезу псевдоаланил-ψ[P(O)(OH)CH₂]-лейцина **8**, перспективного ингибитора матрикс-

цинк-металлопротеиназы 9 типа (MMP-9) [14] (схема 3).

Исследован процесс амидоалкилирования фосфонистой кислоты **9**, содержащей структурный изостер лейцина, с использованием бензилкарбамата и уксусного альдегида в среде ацетилхлорида и(или) уксусного ангидрида как трехкомпонентный вариант карбаматной версии реакции Кабачника–Филдса [11–13] с целью синтеза фосфиновой кислоты **11**, представляющей собой этиловый эфир N-защищенного фосфинового кислого псевдоаланиллейцина N-Cbz-Ala-ψ[P(O)(OH)CH₂]-Leu-OEt. В качестве альтернативного метода изучен двухкомпонентный вариант синтеза взаимодействием фосфонистой компоненты **9** с предварительно синтезированным N,N'-этилиденбис(бензилкарбаматом) **10** [12].

Контроль за ходом реакции осуществляли с помощью метода спектроскопии ЯМР ³¹P по соотношению интенсивностей сигналов фосфиновой кислоты **11** (δ_P ~55 м. д.) и исходной фосфонистой компоненты **9** (δ_P ~32–33 м. д.) в спектре реакционной массы. Установлено, что процесс амидоалкилирования фосфонистой кислоты **9** достаточно быстро протекает в среде ацетилхлорида или в смеси с уксусным ангидридом. Однако в этом случае протекают побочные процессы, связанные

Схема 3.



с частичным дезалкилированием эфирного фрагмента молекулы **11** в процессе амидоалкилирования фосфонистой кислоты **9**. Наблюдаются также побочные реакции с участием ацетальдегида и образованием несодержащих фосфор соединений. Это приводит к тому, что в процессе реакции в заметном количестве не расходуется фосфонистая компонента **9**.

В связи с этим нами были исследованы методики амидоалкилирования кислоты **9** в среде уксусного ангидрида в условиях более мягкого кислотного катализа посредством *n*-толуолсульфокислоты. Побочный процесс дезалкилирования эфирных фрагментов в этом случае отсутствует, однако реакция амидоалкилирования протекает заметно медленнее. Высокий выход целевой кислоты **11** был достигнут при использовании двухкомпонентной версии амидоалкилирования при использовании этилиденбис(бензилкарбамата) **10**, совмещающего в молекуле карбонильный и карбаматный компоненты, так как это позволяет избежать побочных процессов с участием ацетальдегида.

Этилиденбис(бензилкарбамат) **10** был предварительно синтезирован в соответствии с предложенной нами ранее методикой [12]. Синтез фосфонистой кислоты **9** проводили в соответствии с методом, предложенным нами ранее [11] с небольшой модификацией. При этом удалось выделить также и продукт двойного присоединения – фосфиновую кислоту **9а**. Синтез этилового эфира α -изобутилакриловой кислоты осуществляли в соответствии с ранее опубликованной методикой [15].

2-(Этоксикарбонил)-4-метиламилфосфонистая кислота (9). Выход 81%, маслообразное вещество. Спектр ЯМР ^1H ($\text{CCl}_4\text{--CD}_3\text{OD}$), δ , м. д.: 0.97–1.05 уш. т (3H, CH_3), 1.35 д (6H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 1.48 м (1H, CH), 1.65 м (2H, CH_2CH), 2.10 м (2H, CH_2P), 2.83 м [1H, $\text{CHC}(\text{O})$], 4.17 м (2H, CH_2O), 7.05 д (1H, PH, $^1J_{\text{PH}} = 560.0$ Гц), 12.68 уш. с (1H, POOH). Спектр ЯМР ^{31}P ($\text{CCl}_4\text{--CD}_3\text{OD}$): δ_{P} 31.1 м. д. Масс-спектр (ESI), m/z : 223.4 [$M + \text{H}$] $^+$ (вычислено для $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_4\text{P}$: 223.2). Найдено P, %: 13.63, 13.43. $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_4\text{P}$. Вычислено P, %: 13.94.

Бис[2-(этоксикарбонил)-4-метиламил]фосфиновая кислота (9а) была получена в виде слегка желтоватого малоподвижного маслообразного

вещества. Спектр ЯМР ^1H ($\text{CCl}_4\text{--CD}_3\text{OD}$), δ , м. д.: 0.85–0.95 м (6H, CH_3), 1.25–1.35 м (12H, CH_3), 1.43 м (2H, CH), 1.60 м (4H, CH_2CH), 2.05 м (4H, CH_2P), 2.76 м [2H, $2\text{CHC}(\text{O})$], 4.12 м (4H, CH_2O). Спектр ЯМР ^{31}P ($\text{CCl}_4\text{--CD}_3\text{OD}$): δ_{P} 47.1 м. д. Найдено, %: C 56.95, 57.05; H 9.45, 9.50; P 8.33, 8.21. $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_6\text{P}$. Вычислено, % C: 57.13; H 9.32; P 8.18.

2-(Этилоксикарбонил)-4-метиламил-1-(N-бензилоксикарбонил)аминоэтилфосфиновая кислота (11). а. К охлажденной до 5°C смеси 4.4 г (20 ммоль) предварительно высушенной фосфонистой кислоты **9** и 3.0 г (20 ммоль) бензилкарбамата в 25 мл ацетилхлорида добавляли порциями 1.4 мл (25 ммоль) ацетальдегида. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение нескольких часов, затем выливали в 70 мл воды со льдом, и упаривали в вакууме при температуре бани не выше 35°C. Остаток обрабатывали 70 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия. Водную фазу промывали диэтиловым эфиром (2×10 мл), осторожно подкисляли раствором 1 н. HCl до pH ~2 и затем экстрагировали хлороформом (3×10 мл) или этилацетатом. Объединенный органический экстракт сушили сульфатом магния и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на силикагеле [элюент – хлороформ, хлороформ–изопропанол (5–7%)]. Элюат упаривали в вакууме, остаток кристаллизовался самопроизвольно, а также после обработки диэтиловым или петролевым эфиром (40/70). Фосфиновая кислота **11** была выделена после дополнительной кристаллизации из петролевого эфира. Выход 4.1 г (51%), т. пл. 74–77°C.

б. Амидоалкилирование фосфонистой кислоты **9** в смеси ацетилхлорида и уксусного ангидрида позволила выделить целевой продукт **11** с выходом 58%, т. пл. 77–78°C.

в. Синтез в среде уксусного ангидрида с добавлением *n*-толуолсульфокислоты (3 мол%) позволил получить кислоту **11** с выходом 71%, т. пл. 78–80°C.

г. Двухкомпонентный вариант синтеза был проведен с использованием предварительно синтезированного *N,N'*-этилиденбис(бензилкарбамата) **10** [12] также при использовании *n*-толуолсульфокислоты (3 мол%). К перемешиваемой смеси 2.2 г (10 ммоль) безводной фосфонистой кислоты **9** и

3.3 г (10 ммоль) *N,N'*-этилиденбис(бензилкарбамата) **10** в 20 мл уксусного ангидрида добавляли 0.05 г (0.3 ммоль) *n*-толуолсульфокислоты. Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре, наблюдая за ходом реакции с помощью ЯМР ^{31}P . По завершении реакции смесь фильтровали, фильтрат обрабатывали аналогично методике *a*. Выход 3.3 г (83%), т. пл. 80–81°C, $R_f \sim 0.20\text{--}0.35$ ($\text{CHCl}_3\text{:EtOH} = 5\text{:}1$) (двойное пятно, что обусловлено наличием диастереомеров). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 0.84 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Гц), 0.88 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Гц), 1.21 т (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 1.34 д. д (3H, CH_3CH , $^3J_{\text{HH}} = 6.5$, $^3J_{\text{PH}} = 14.5$ Гц), 1.45–1.80 м (4H, $\text{PCH}_2 + \text{CHCH}_2\text{CH}$), 2.00–2.27 м (1H, CHCH_3), 2.70–2.92 м [1H, $\text{CHC}(\text{O})$], 3.90–4.05 м (1H, PCHN), 4.11 к (2H, CH_2O , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 5.10 уш. с (2H, OCH_2Ph), 5.38 уш. д (1H, NH, $^3J_{\text{HH}} = 8.6$ Гц), 6.50 уш. с (1H, POOH), 7.33 с (5H, Ph). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ_{C} , м. д.: 13.84* (здесь и далее звездочкой отмечен сигнал минорного диастереомера), 14.05, 20.88*, 21.84, 22.32*, 22.67, 25.06*, 25.73, 28.67 д ($^1J_{\text{PC}} = 95.1$ Гц), 28.96* д ($^1J_{\text{PC}} = 91.6$ Гц), 37.12, 43.17* д ($^3J_{\text{PC}} = 8.8$ Гц), 43.37 д ($^3J_{\text{PC}} = 11.1$ Гц), 45.10* д ($^1J_{\text{PC}} = 103.5$ Гц), 45.85 д ($^1J_{\text{PC}} = 104.3$ Гц), 60.71, 67.04, 127.97, 128.09, 128.44, 136.18, 155.86 д ($^3J_{\text{PC}} = 5.0$ Гц), 175.1. Спектр ЯМР ^{31}P (CDCl_3), δ_{P} , м. д.: 54.7*, 55.0. Масс-спектр (ESI), m/z : 400.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (вычислено для $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{P}$: 400.4). Найдено, %: C 56.68, 56.92; H 7.78, 7.87. $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{P}$. Вычислено, %: C 57.13; H 7.57.

2-(Гидроксикарбонил)-4-метиламил-1-аминоэтилфосфиновая кислота (псевдоаланиллейцин) (8). Фосфиновую кислоту **11** (1.1 г, 2.8 ммоль) кипятили в 15 мл 6 н. HCl в течение 17 ч. Охлажденный раствор обрабатывали хлороформом (2×5 мл). Водную фазу упаривали в вакууме и остаток хроматографировали на катионите (элюент – H_2O , затем 0.5 н. HCl). Элюат, имеющий положительную реакцию на нингидрин, упаривали в вакууме. Остаток (~0.6 г) растворяли в 5.5 мл водного спирта (~1:10), обрабатывали 0.5 мл (7 ммоль) окиси пропилена и выделяли 0.4 г (62%) аминокислоты **8**. Аминокислота **8** представляет собой кристаллический порошок, ограниченно растворимый в воде при собственном pH, поэтому ниже приведены спектральные дан-

ные в кислой и щелочной среде, в последнем случае наличие диастереомеров проявляется в большей степени. Выход 62%, т. пл. 197–199°C (разл.). Спектр ЯМР ^1H ($\text{D}_2\text{O}\text{--}\text{DCl}$, pH = 1), δ , м. д.: 0.48 д (3H, CH_3CHC , $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Гц), 0.52 д (3H, CH_3CHC , $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Гц), 1.08 д. д (3H, CH_3CHP , $^3J_{\text{PH}} = 14.7$, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Гц), 1.14–1.32 м [3H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 1.56–1.74 м (1H, PCH_2), 1.78–1.98 м (1H, PCH_2), 2.35–2.57 м [1H, $\text{CHC}(\text{O})$], 3.10–3.30 м (1H, CHN). Спектр ЯМР ^1H ($\text{D}_2\text{O}\text{--}\text{NaOD}$, pH ~9), δ , м. д.: 0.78 д (3H, CH_3CHC , $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Гц), 0.82 д (3H, CH_3CHC , $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Гц), 1.12 д. д (3H, CH_3CHP , $^3J_{\text{PH}} = 14.7$, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Гц), 1.14* д. д (3H, CH_3CHP , $^3J_{\text{PH}} = 13.5$, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Гц), 1.25–1.60 м [4H, $\text{PCH}_2 + \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 1.71–1.99 м (1H, PCH_2), 2.42–2.60 м [1H, $\text{CHC}(\text{O})$], 2.68–2.87 м (1H, CHN). Спектр ЯМР ^{13}C ($\text{D}_2\text{O}\text{--}\text{DCl}$, pH = 1), δ_{C} , м. д.: 12.24*, 12.30, 21.29, 21.86*, 21.93, 25.3, 28.50* д ($^1J_{\text{PC}} = 92.7$ Гц), 28.64 д ($^1J_{\text{PC}} = 93.1$ Гц), 37.20 д ($^2J_{\text{PC}} = 4.8$ Гц), 42.61 д ($^3J_{\text{PC}} = 11.6$ Гц), 45.28* д ($^1J_{\text{PC}} = 97.0$ Гц), 45.35 д ($^1J_{\text{PC}} = 96.6$ Гц), 179.44 д ($^3J_{\text{PC}} = 5.2$ Гц). Спектр ЯМР ^{13}C ($\text{D}_2\text{O}\text{--}\text{NaOD}$, pH ~9), δ_{C} , м. д.: 13.18*, 14.24, 21.41, 21.60*, 22.62*, 22.86, 25.94*, 26.10, 31.16* д ($^1J_{\text{PC}} = 90.9$ Гц), 31.56 д ($^1J_{\text{PC}} = 90.9$ Гц), 41.42 д ($^2J_{\text{PC}} = 2.7$ Гц), 43.74 д ($^3J_{\text{PC}} = 7.7$ Гц), 43.91 д ($^3J_{\text{PC}} = 9.6$ Гц), 45.66* д ($^1J_{\text{PC}} = 93.2$ Гц), 46.16 д ($^1J_{\text{PC}} = 92.8$ Гц), 184.92 д ($^3J_{\text{PC}} = 8.4$ Гц), 185.02* д ($^3J_{\text{PC}} = 6.5$ Гц). Спектр ЯМР ^{31}P ($\text{D}_2\text{O}\text{--}\text{DCl}$, pH = 1): δ_{P} 44.3 м. д. Спектр ЯМР ^{31}P ($\text{D}_2\text{O}\text{--}\text{NaOD}$, pH ~9), δ_{P} , м. д.: 43.1, 43.5*. Найдено, %: C 45.35, 45.26; H 9.02, 9.17; N 6.04, 6.13. $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{NO}_4\text{P}$. Вычислено, %: C 45.57; H 8.50; N 5.90.

Спектры ^1H , ^{31}P и ^{13}C ЯМР снимали на Фурье-спектрометре Bruker DPX-200. Для ионо-обменной хроматографии использовали катионит Purolite C100E (H^+). Температуру плавления определяли в блоке в открытом капилляре. Хроматографический анализ проводили на LC/MSD системе Agilent 1100 серии с DAD, ELSD и одноквадрольным масс-селективным детектором с ионизацией электроспреем.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Института физиологически активных веществ РАН на 2019 год (тема № 0090-2019-008) при частичной финансовой поддержке Программы Президиума РАН № 14П,

Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 18-03-00959, 18-03-01123) и Российского научного фонда (грант № 19-13-00294, хроматографический, спектральный и элементный анализ).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Notni J., Simecek J., Hermann P., Wester H.-J. // Chem. Eur. J. 2011. Vol. 17. P. 14718. doi 10.1002/chem.201103503
2. Mucha A. // Molecules. 2012. Vol. 17. P. 13530. doi 10.3390/molecules171113530
3. Zinc Metalloproteases in Health and Disease / Ed. N.M. Hooper. London: Taylor and Francis, 1996. P. 153.
4. Hori M., Nishida K. // Cardiovasc. Res. 2009. Vol. 81. N 3. P. 457. doi 10.1093/cvr/cvn335
5. Whittaker M., Ayscough A. // Celltransmissions (Sigma Aldrich Inc.). 2001. Vol. 17. N 1. P. 3.
6. Pirad B., Matter H. // J. Med. Chem. 2006. Vol. 49. N 1. P. 51. doi 10.1021/jm050363f
7. Georgiadis D., Dive V. // Top. Curr. Chem. 2015. Vol. 360. P. 1. doi 10.1007/128_2014_571
8. Baylis E.K., Campbell C.D., Dingwall J.G. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1984. P. 2845. doi 10.1039/P19840002845
9. McCleery P.P., Tuck B. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1989. P. 1319. doi 10.1039/P19890001319
10. Rozhko L.F., Ragulin V.V. // Amino Acids. 2005. Vol. 29. N 2. P. 139. doi 10.1007/s00726-005-0194-9
11. Dmitriev M.E., Ragulin V.V. // Tetrahedron Lett. 2010. Vol. 51. N 19. P. 2613. doi 10.1016/j.tetlet.2010.03.020
12. Дмитриев М.Э., Россинец Е.А., Рагулин В.В. // ЖОХ. 2011. Т. 81. Вып. 6. С. 898; Dmitriev M.E., Rossinets E.A., Ragulin V.V. // Russ. J. Gen. Chem. 2011. Vol. 81. N 6. P. 1092. doi 10.1134/S1070363211060041
13. Dmitriev M.E., Ragulin V.V. // Tetrahedron Lett. 2012. Vol. 53. N 13. P. 1634. doi 10.1016/j.tetlet.2012.01.094
14. Eckhard U., Huesgen P.F., Schilling O., Bellac C.L., Butler G.S., Cox J.H., Dufour A., Goebeler V., Kappelhoff R., Keller U., Klein T., Lange P.F., Marino G., Morrison C.J., Prudova A., Rodriguez D., Starr A.E., Wang Y., Overall C.M. // Matrix Biol. 2016. Vol. 49. P. 37. doi 10.1016/j.matbio.2015.09.003
15. Stetter H., Kuhlmann H. // Synthesis. 1979. N 1. P. 29. doi 10.1055/s-1979-28537

Synthesis of Phosphinic Analogue of Alanyleucine

S. R. Golovash^a, O. S. Grigorkevich^b, G. S. Tsebrikova^c, M. E. Dmitriev^a, and V.V. Ragulin^{a,*}

^a Institute of Physiologically Active Substances of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432 Russia

^b V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 125315 Russia

^c A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: rvalery@dio.ru

Received September 27, 2019; revised September 27, 2019; accepted October 5, 2019

The amidoalkylation reactions of a phosphonous acid containing a structural isostere of leucine in acetyl chloride and(or) acetic anhydride were studied under conditions of acid catalysis. A two-component method for the synthesis of a phosphine analog of alanyleucine using ethylidenebis(benzylcarbamate) was proposed.

Keywords: pseudo-alanyleucine, matrix metalloproteinases (MMPs), zinc metalloproteinase inhibitors, amidoalkylation, phosphinic structural isosteres