



УДК 577.32'17.012:543.422.25

СИНТЕЗ И АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО RGDF-МИМЕТИКА

© 2004 г. А. А. Крысько[#], О. Л. Маловичко, Т. А. Кабанова, А. В. Мазепа

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, 65080,

Одесса, Люстдорфская дорога, 86

Поступила в редакцию 15.10.2003 г. Принята к печати 01.02.2004 г.

Новый RGDF-миметик – *m*-[4-оксо-4-(пиперазин-1-ил)бутириламино]бензоил-*D,L*-β-(3,4-метилendioксифенил)-β-аланин. RGDF-миметик обладает способностью ингибировать агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме человеческой крови, вызванную ADP, с $IC_{50} = 3.5 \times 10^{-8}$ М.

Ключевые слова: RGDF-миметик, агрегация тромбоцитов, GP IIb/IIIa, пептидный синтез.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых антитромботических и антиагрегационных средств, обладающих высокой эффективностью и низкой токсичностью, – одна из важных задач биоорганической и медицинской химии.

В последние 10 лет большое внимание уделяется группе антиагрегантов, являющихся антагонистами фибриногеновых рецепторов (GP IIb/IIIa). Ответственна за связывание фибриногена с фибриногеновыми рецепторами трипептидная RGD-последовательность (Arg-Gly-Asp). Небольшие белки и пептиды, содержащие RGD-последовательность, являются антагонистами фибриногеновых рецепторов, поэтому для предотвращения агрегации тромбоцитов можно использовать в качестве ингибиторов пептиды с вышеуказанной аминокислотной последовательностью. Молекулярный дизайн потенциальных антагонистов фибриногеновых рецепторов, с целью повышения селективности и аффинитета, включает моделирование структур, содержащих эту последовательность или имитирующих ее фрагменты.

В молекулах высокоактивных RGDF-миметиков между их связывающими центрами – концевыми основной группировкой (в качестве которой могут быть использованы гуанидино-, амидино-, amino- и др.) и карбоксильной функцией – должно быть определенное расстояние (10–15 Å) [1]. Этим условиям удовлетворяет структура пептидомиметика (II), к которой авторы работы [2] пришли путем модификации циклопептида (I)

(схема 1). Введение остатка *m*-аминобензойной кислоты обеспечивает достаточную жесткость молекулы миметика, что оказывает положительное влияние на активность. Значение IC_{50} для антиагрегационной активности соединения (II) составляет 200 нМ [2].

Ранее был синтезирован ряд линейных RGDF-миметиков (III), (IV) на основе 4-оксо-4-(пиперазин-1-ил)бутановой кислоты, моделирующей остаток Arg. Asp-Phe-участок заменен остатками β-замещенных β-аланинов [3–5].

Данные соединения обладали достаточно высокой антиагрегационной активностью (IC_{50} в пределах 10^{-6} – 10^{-8} М). Методом флуоресцентного анализа было изучено сродство к фибриногеновым рецепторам наиболее активных соединений [4, 5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель данной работы – синтез нового RGDF-пептидомиметика (XII), содержащего в качестве Arg-миметика остаток 4-оксо-(4-пиперазин-1-ил)бутановой кислоты, фрагмент *m*-аминобензойной кислоты и остаток *D,L*-β-(3,4-метилendioксифенил)-β-аланина. Наличие гидрофобного радикала в *C*-концевой части миметика необходимо для его эффективного связывания с рецептором [6].

Синтез псевдопептида (XII) представлен на схеме 2. В качестве исходного соединения использовали 4-оксо-4-(4-вос-пиперазин-1-ил)бутановую кислоту (V) [3]. Конденсацию *m*-аминобензойной кислоты и Вос-производного (V) проводили тремя методами. Первый заключался в использовании смешанного ангидрида (VIII), который получали из триэтиламмониевой соли кислоты (V) и *изо*-бутилхлорформиата, второй метод – в использовании OSu-эфира (VI), в третьем методе

Сокращения: βAla – β-аланин; DCC – *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид; FAB – fast atom bombardment; HONSu – *N*-гидроксисукцинимид; PfpOH – пентафторфенол; Piz – пиперазинил; Suc – сукцинил.

[#]Автор для переписки (тел.: +38-482-66-30-41; эл. почта: peptides@paco.net).

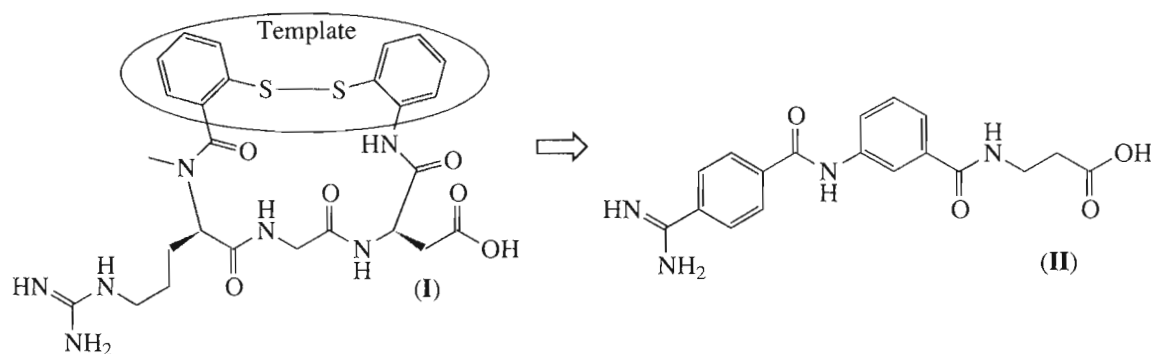


Схема 1. Переход от циклопептида (I) к RGDF-миметику (II).

был использован Pfr-эфир (VII). Эфиры (VI) и (VII) получали из кислоты (V), соответствующего спирта (HONSu или PfrOH) и DCC. Производными (VI)–(VIII) ацилировали аминогруппу *m*-аминобензойной кислоты. Наилучший результат был достигнут при использовании Pfr-эфира (VII), в среднем выход Вос-производного (IX) составлял около 80%. Следующим этапом была активация карбоксильной группы соединения (IX). Для этого мы использовали HONSu и DCC. В результате был получен OSu-эфир (X), последующее взаимодействие которого с натриевой солью *D,L*-β-(3,4-метилендиоксифенил)-β-аланина [7] привело к образованию Вос-производного (XI). Ацидолитическим удалением Вос-группы последнего мы получили целевое соединение (XII).

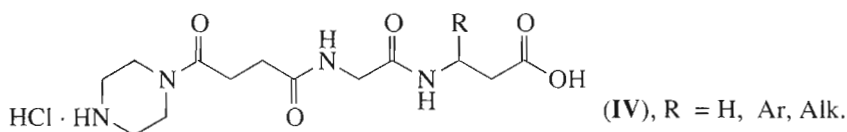
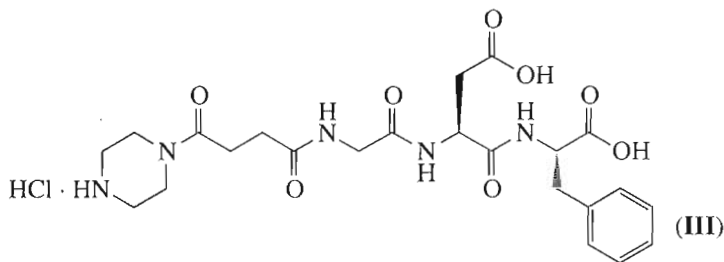
Структура полученных соединений была подтверждена с помощью методов масс-спектрометрии и спектроскопии ¹H-ЯМР. В спектрах ¹H-ЯМР полученных соединений присутствовали все характерные сигналы протонов с соответствующими интегральными интенсивностями.

Антиагрегационная активность синтезированного RGDF-миметика (XII) изучалась на богатой тромбоцитами плазме человеческой крови по методу Борна [8]. Соединение (XII) ингибировало ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов с

IC₅₀ = 3.5 × 10⁻⁸ М. Следует отметить, что для RGDF-пептида значение IC₅₀ составляло 1.9 × 10⁻⁶ М, что свидетельствует о высокой антиагрегационной активности RGDF-миметика (XII).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ¹H-ЯМР записаны в растворах DMSO-*d*₆ (99.9%) на приборе Varian WXP-300 (Varian, Германия) с рабочей частотой 299.95 МГц, внутренний стандарт – тетраметилсилан, при температуре 25°C. Масс-спектр соединения (VI) записан на масс-спектрометре MX-1321 (НПО Науч. прибор, Россия) (ионизирующее напряжение 70 эВ, температура камеры ионизации 200°C). Масс-спектры FAB записаны на приборе VG 7070 (VG, Великобритания) с использованием глицериновой матрицы, ионизация осуществлялась пучком атомов Хе с энергией 8 кВ. Чистоту соединений контролировали методом ВЭЖХ, хроматограф DuPont 8800 (DuPont Instruments, США), аналитическая колонка Zorbax C8 (DuPont Instruments, США), подвижная фаза – ацетонитрил–вода, 4 : 1. ТСХ осуществляли на пластинках Silufol (Kavalier, Чехия) и Kieselgel 60 (Merck, Германия) в следующих системах растворителей: бензол–ацетон–уксусная кислота, 100 : 50 : 1 (А); метанол–



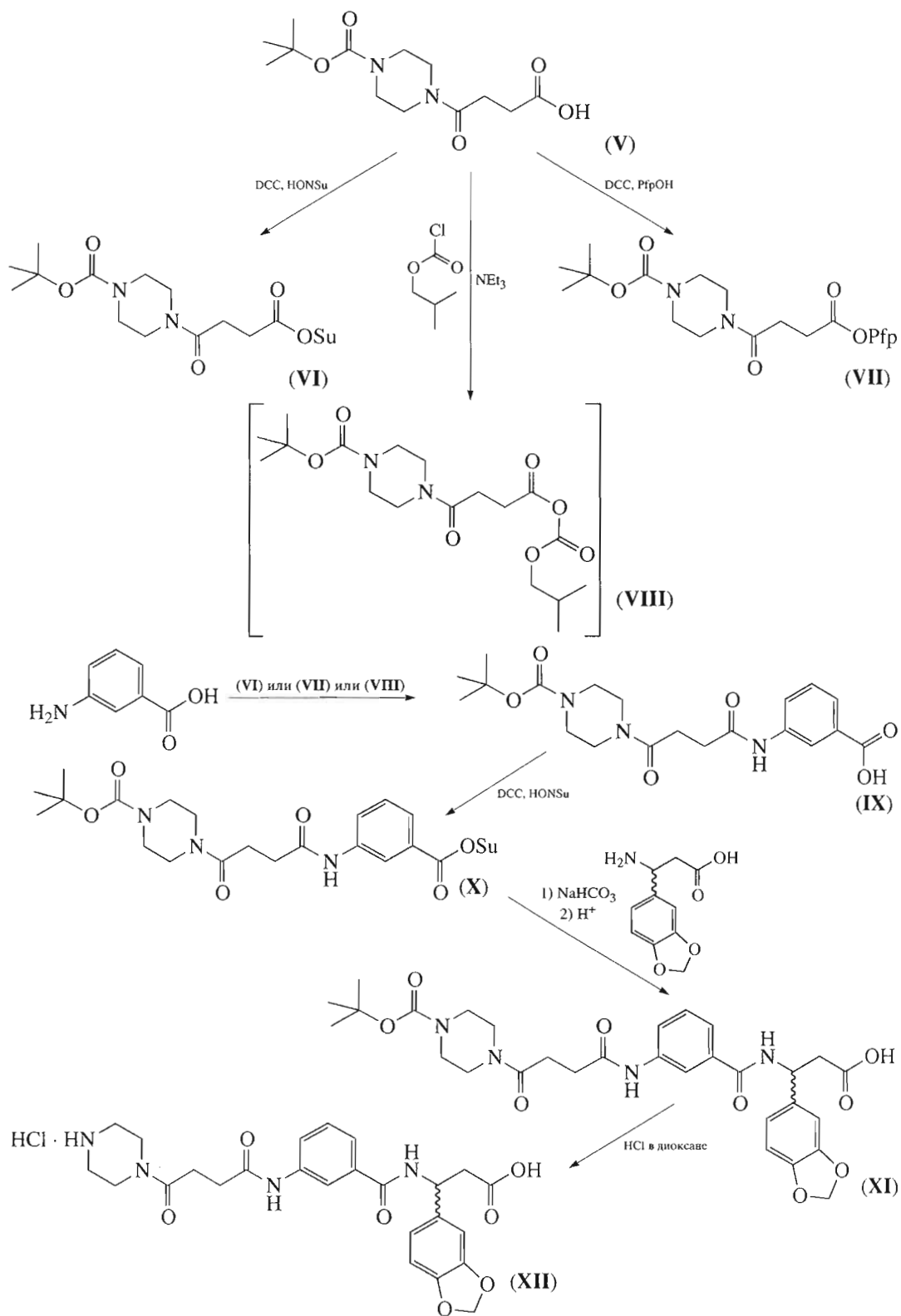


Схема 2. Синтез *m*-[4-оксо-4-(пиперазин-1-ил)бутириламино]бензоил-*D,L*-β-(3,4-метилendioксифенил)-β-аланина (XII).

NH_4OH , 4 : 1 (Б); хлороформ–этилацетат–метанол, 9 : 3 : 2 (В); хлороформ–этилацетат–метанол–уксусная кислота, 9 : 3 : 2 : 1 (Г). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидринового и хлортолуидинового реактивов.

В описании спектров ^1H -ЯМР используются следующие обозначения: Ar- βAla – ароматические протоны остатка β -(3,4-метилendioксифенил)- β -аланина, $^\alpha\text{CH}_2$ - βAla – α -протоны остатка β -арилзамещенного β -аланина, $^\beta\text{CH}$ - βAla – β -протон остатка β -арилзамещенного β -аланина, CH_2 -NSu – протоны сукцинимиды, CH_2 -Suc – протоны сукцинилы, CH_2 -Piz – протоны пиперазина, NH- βAla – амидный протон остатка β -замещенного β -аланина.

Сукцинимидный эфир 4-оксо-4-(4-вос-пиперазин-1-ил)бутановой кислоты (VI). К раствору 5 г (17.5 ммоль) кислоты (V) [3] в 40 мл абсолютного THF прибавляли 2.414 г (20.9 ммоль) HONSu и 4.329 г (20.9 ммоль) DCC. Раствор охлаждали до 0°C и перемешивали при этой температуре 4 ч. По окончании реакции выпавшую за это время N,N' -дициклогексилмочевину отфильтровывали, а растворитель упаривали в вакууме при температуре не выше 35°C . Остаток перекристаллизовывали из изопропанола. Выпавший продукт отфильтровывали, промывали холодным изопропанолом и эфиром. Сушили в эксикаторе над CaCl_2 . Выход 5.825 г (87%), R_f 0.41 (A), 0.56 (Г), т. пл. 155 – 159°C . Масс-спектр, m/z (I, %): 383 (5.1), 327 (6.4), 310 (12.7), 269 (22.4), 213 (40.6), 212 (14.4), 211 (5.2), 168 (6.0), 167 (5.8), 115 (9.3), 100 (11.5), 97 (12.5), 86 (5.0), 84 (20.9), 83 (6.8), 69 (16.4), 58 (6.1), 57 (100), 56 (33.8), 55 (45.1). Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д.): 1.41 (9 H, с, CH_3 -Boc), 2.70 (2 H, т, CH_2 -NSuc), 2.79 (4 H, с, CH_2 -NSu), 2.87 (2 H, т, CH_2 -Suc), 3.28–3.34 (4 H, м, CH_2 -Piz), 3.42–3.4 (4 H, м, CH_2 -Piz).

m -[4-Оксо-4-(4-вос-пиперазин-1-ил)бутирил-амино]бензойная кислота (IX). Метод А. К раствору 1 г (3.5 ммоль) кислоты (V) в 15 мл хлороформа прибавляли 0.58 мл (4.2 ммоль) триэтиламина. Раствор охлаждали до -5°C и прибавляли 0.5 мл (3.8 ммоль) *изо*-бутилхлорформиата. Смесь выдерживали 1 ч при -5°C , затем прибавляли 0.578 г (4.2 ммоль) *m*-аминобензойной кислоты. Смесь кипятили 3 ч. Хлороформ промывали 1 М раствором HCl (2×10 мл), водой (2×10 мл) и насыщенным раствором NaCl (10 мл). Хлороформ сушили безводным сульфатом натрия. Сульфат натрия отфильтровывали, хлороформ упаривали, а оставшуюся массу сушили в вакууме. Маслообразный остаток заливали эфиром и растирали. Продукт кристаллизовался, его отфильтровывали, промывали эфиром и сушили. Выход 0.76 г (35%).

Метод Б. К раствору 10 г (26 ммоль) OSu-эфира (VI) в 40 мл THF прибавляли 4.29 г (31 ммоль) *m*-аминобензойной кислоты. Смесь кипятили 3 ч. По окончании реакции THF упаривали при пониженном давлении. К остатку добавляли 50 мл во-

ды и подкисляли конц. HCl до pH 3–4, затем экстрагировали хлороформом. Хлороформные вытяжки объединяли, промывали 1 М раствором HCl (2×50 мл), водой (2×50 мл) и насыщенным раствором NaCl (50 мл). Хлороформ сушили безводным сульфатом натрия. Сульфат натрия отфильтровывали, хлороформ упаривали, а оставшуюся массу сушили в вакууме. Маслообразный остаток заливали эфиром и растирали. Продукт кристаллизовался, его отфильтровывали, промывали эфиром и сушили. Выход 6.66 г (63%).

Метод В. Метод основан на реакции Pfr-эфира (VII) [3] с *m*-аминобензойной кислотой. Получение продукта и его выделение проводятся аналогично методу Б. Выход 87%, R_f 0.39 (B), 0.45 (Г), т. пл. 155°C . Масс-спектр FAB, m/z : 406 [$M + \text{H}$] $^+$. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д.): 1.41 (9 H, с, CH_3 -Boc), 2.63 (4 H, дд, CH_2 -Suc), 3.28–3.36 (4 H, м, CH_2 -Piz), 3.42–3.46 (4 H, м, CH_2 -Piz), 7.41 (1 H, т, Ar), 7.59 (1 H, д, Ar), 7.80 (1 H, д, Ar), 8.24 (1 H, с, Ar), 10.14 (1 H, с, NH), 12.92 (1 H, уш. с, COOH).

Сукцинимидный эфир *m*-[4-оксо-4-(4-вос-пиперазин-1-ил)бутириламино]бензойной кислоты (X). К раствору 7.087 г (17.5 ммоль) кислоты (IX) в 30 мл абсолютного THF прибавляли 2.414 г (20.9 ммоль) HONSu и 4.329 г (20.9 ммоль) DCC. Раствор охлаждали до 0°C и перемешивали при этой температуре 4 ч. По окончании реакции выпавшую N,N' -дициклогексилмочевину отфильтровывали, а растворитель упаривали в вакууме при температуре не выше 35°C . Остаток перекристаллизовывали из изопропанола. Выпавший продукт отфильтровывали, промывали холодным изопропанолом и эфиром. Сушили в эксикаторе над CaCl_2 . Выход 7.028 г (80%), R_f 0.52 (B), т. пл. 185 – 189°C . Масс-спектр FAB, m/z : 503 [$M + \text{H}$] $^+$. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д.): 1.41 (9 H, с, CH_3 -Boc), 2.63 (4 H, дд, CH_2 -Suc), 2.79 (4 H, с, CH_2 -NSu), 3.29–3.36 (4 H, м, CH_2 -Piz), 3.42–3.46 (4 H, м, CH_2 -Piz), 7.58 (1 H, т, Ar), 7.74 (1 H, д, Ar), 7.91 (1 H, д, Ar), 8.49 (1 H, с, Ar), 10.33 (1 H, с, NH).

m -[4-Оксо-4-(4-вос-пиперазин-1-ил)бутирил-амино]бензоил-*D,L*- β -(3,4-метилendioксифенил)- β -аланин (XI). К раствору 3.413 г (6.8 ммоль) OSu-эфира (X) в 20 мл свежеперегнанного THF при перемешивании прибавляли раствор 1.421 г (8.2 ммоль) β -(3,4-метилendioксифенил)- β -аланина [7] и 0.687 г (8.2 ммоль) NaHCO_3 в 20 мл воды. По окончании реакции раствор упаривали в вакууме в 2 раза, затем подкисляли 3 н. HCl до pH 4 и экстрагировали хлороформом (3×50 мл). Органический слой промывали 1 н. HCl (10 мл), затем водой (10 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Полученный маслянистый остаток для дальнейшей очистки растирали с горячим эфиром, охлаждали и отфильтровывали. Выход 3.85 г (95%), R_f 0.47 (B), 0.58 (Г), т. пл. 160°C . Масс-спектр FAB, m/z : 619 [$M + \text{Na}$] $^+$, 641 [$M - \text{H} + 2\text{Na}$] $^+$.

Спектр $^1\text{H-NMR}$ (δ , м. д.): 1.41 (9 H, с, $\text{CH}_3\text{-Boc}$), 2.60 (4 H, дд, $\text{CH}_2\text{-Suc}$), 2.80 (2 H, ддд, $^{\alpha}\text{CH}_2\text{-}\beta\text{Ala}$), 3.29–3.45 (8 H, м, $\text{CH}_2\text{-Piz}$), 5.34 (1 H, к, $^{\beta}\text{CH-}\beta\text{Ala}$), 5.97 (2 H, с, $\text{O-CH}_2\text{-O}$), 6.82–6.88 (2 H, м, $\text{Ar-}\beta\text{Ala}$), 7.00 (1 H, с, $\text{Ar-}\beta\text{Ala}$), 7.36 (1 H, т, Ar), 7.47 (1 H, д, Ar), 7.77 (1 H, д, Ar), 7.95 (1 H, с, Ar), 8.74 (1 H, д, $\text{NH-}\beta\text{Ala}$), 10.06 (1 H, с, NH-Ar), 12.21 (1 H, уш. с, COOH).

Гидрохлорид *m*-[4-оксо-4-(пиперазин-1-ил)бутириламино]бензоил-*D,L*- β -(3,4-метилendioксифенил)- β -аланина (XII). Суспензию 0.5 г (1 ммоль) Вос-производного (XI) в 10 мл 4 М раствора HCl в диоксане перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Затем растворитель упаривали. Твердый остаток сушили 5 ч при температуре 40°C и давлении 3 мм рт. ст. Вещество гигроскопично. Выход 0.536 г (количеств.), R_f 0.6 (Б). Масс-спектр FAB, m/z : 497 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 519 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 541 $[\text{M} - \text{H} + 2\text{Na}]^+$. Спектр $^1\text{H-NMR}$ (δ , м. д.): 2.62 (4 H, дд, $\text{CH}_2\text{-Suc}$), 2.70–2.90 (2 H, м, $^{\alpha}\text{CH}_2\text{-}\beta\text{Ala}$), 3.49 (4 H, д, $\text{CH}_2\text{-Piz}$), 3.71 (4 H, д, $\text{CH}_2\text{-Piz}$), 5.33 (1 H, к, $^{\beta}\text{CH-}\beta\text{Ala}$), 5.98 (2 H, с, $\text{O-CH}_2\text{-O}$), 6.85 (2 H, с, $\text{Ar-}\beta\text{Ala}$), 7.01 (1 H, с, $\text{Ar-}\beta\text{Ala}$), 7.37 (1 H, т, Ar), 7.49 (1 H, д, Ar), 7.76 (1 H, д, Ar), 7.97 (1 H, с, Ar), 8.79 (1 H, д, $\text{NH-}\beta\text{Ala}$), 9.25 (2 H, с, H_2N^+), 10.16 (1 H, с, NH-Ar), 12.41 (1 H, уш. с, COOH).

Фармакологическая часть. Изучение агрегации тромбоцитов проводилось на богатой тромбоцитами плазме (БТП) [8], полученной из цитратной крови человека центрифугированием при 200 g в течение 15 мин. Агрегацию тромбоцитов измеряли по увеличению светопропускания на агрегометре “Thromlite 1006A” фирмы “Биохиммак” (Москва), присоединенному к записывающему устройству. БТП (250 мкл) инкубировали с различными концентрациями исследуемого вещества (XII) при 37°C в течение 1 мин перед добавлением ADP (конечная концентрация 10 мкМ). Агре-

гацию тромбоцитов измеряли в течение 2 мин (максимальная агрегация). Для количественной характеристики биологической активности RGDF-миметика (XII) использовалась величина IC_{50} – концентрация вещества, при которой максимальная амплитуда агрегации тромбоцитов составляет 50% исходного уровня.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zablocki J.A., Rico J.G., Garland R.B., Rogers T.E., Williams K., Schretzman L.A., Rao S.A., Bovy P.R., Tjoeng F.S., Lindmark R.J., Toth M.V., Zupec M.E., McMackins D.E., Adams S.P., Miyano M., Markos C.S., Milton M.N., Paulson S., Herin M., Jacqmin P., Nicholson N.S., Panzerknodle S.G., Haas N.F., Page J.D., Szalony J.A., Taite B.B., Salyers A.K., King L.W., Campion J.G., Feigen L.P. // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. P. 2378–2394.
2. Alig L., Edenhofer A., Hadvary P., Hurzeler M., Knopp D., Muller M., Steiner B., Trzeciak A., Weller T. // *J. Med. Chem.* 1992. V. 35. P. 4393–4407.
3. Крысько А.А., Кабанов В.М., Полищук П.Г., Чугунов Б.М., Павловский В.И., Андронати С.А., Мазепа А.В., Кабанова Т.А., Карасёва Т.Л. // *Журн. общей химии.* 2000. Т. 70. С. 1013–1017.
4. Andronati S.A., Krysko A.A., Kabanov V.M., Karaseva T.L., Kabanova T.A. // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* 2000. V. 57. P. 15–21.
5. Andronati S.A., Krysko A.A., Kabanov V.M., Kabanova T.A., Karaseva T.L., Chugunov B.M., Meshkova S.B., Topilova Z.M. // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* 2004. V. 60. P. 375–381.
6. Sugihara H., Fukushi H., Miyawaki T., Imai Y., Terashita Z., Kawamura M., Fujisawa Y., Kita S. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 489–502.
7. Родионов В.М. Избранные труды. М.: Изд-во АН СССР, 1958. 702 с.
8. Born G.V.R. // *Nature.* 1962. V. 194. P. 927–929.

Synthesis and Antiaggregative Activity of a New RGDF Mimetic

A. A. Krysko[#], O. L. Malovichko, T. A. Kabanova, and A. V. Mazepa

[#]Phone: (+38) 482-66-3041; e-mail: peptides@paco.net
Bogatsky Physicochemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine,
Lustdorfskaya doroga 86, Odessa, 65080 Ukraine

m-[4-Охо-4-(пиперазин-1-ил)бутириламино]бензоил-*D,L*- β -(3,4-метилendioксифенил)- β -аланин, а новый миметик пептида RGDF, был синтезирован. Это соединение ингибировало ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами человеческой крови с IC_{50} 3.5×10^{-8} М. Английская версия статьи: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: GP IIb/IIIa, peptide synthesis, platelet aggregation, RGDF mimetic