

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ
АРМЕНИЯ

Հայաստանի քիմիական հանդես 64, №4, 2011 Химический журнал Армении

УДК 547.466

СИНТЕЗ N-ФОРМИЛДИ- И ТРИПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
(S)- β -(4-ФЕНИЛ-3-ПРОПИЛ-5-ТИОКСО-1,2,4-ТРИАЗОЛ-1-ИЛ)-
 α -АЛАНИНА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ВЛИЯНИЯ НА АКТИВНОСТЬ
СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ

Т. О. САРГСЯН

Научно-производственный центр «Армбиотехнология»
НАН Республики Армения
Армения, 0056, Ереван, ул. Гюрджяна, 14
Факс: (374-10)654183, E-mail: saghyan@netsys.am

Поступило 20 X 2011

Синтезированы новые N-формилди- и трипептиды с использованием N-формил-(S)-метионина и (S)- β -(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)- α -аланина. Исследовано влияние пептидов на активность трипсина и протеиназы К. Показано, что дипептид – N-формил-(S)-метионил-(S)- β -(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)- α -аланин, оказывает ингибирующее действие на протеиназу К, а трипептид – N-формил-(S)-метионилглицил-(S)- β -(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)- α -аланин, понижает активность как протеиназы К, так и трипсина.

Табл. 1, библиографических ссылок 8.

Благодаря широкому спектру фармакологических свойств пептиды представляют научный и практический интерес для специалистов синтетической и фармацевтической химии. В их ряду особое место занимают пептиды, содержащие неприродные аминокислоты, например, аналоги дипептида карнозина (с последовательностью Ala-His), – дипептиды *ансерин* (β -аланил-1-метилгистидин) и *баленин* (β -аланил-3-метилгистидин), обладающие ярко выраженными антиоксидантными и рН регулирующими свойствами в мышечных клетках [1]. Пептиды, содержащие оксилейцин и аллилглицин, ингибируют сериновые протеазы [2].

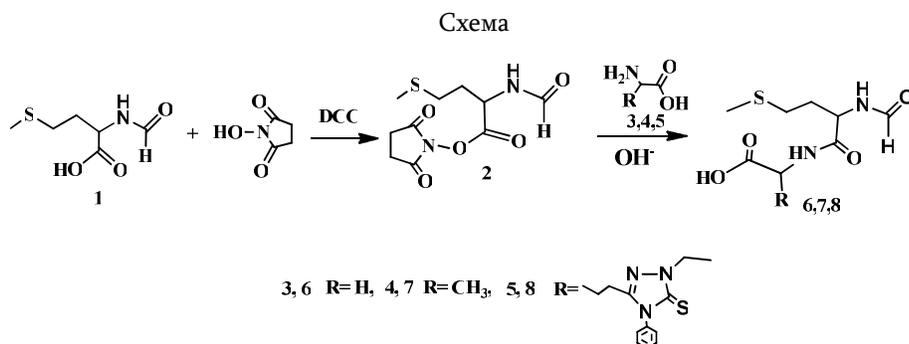
Важной задачей является также выбор объектов, с помощью которых осуществляется изучение биологической активности пептидов. Известно, что в организме многие патологические нарушения вызваны

расстройством механизмов регуляции ферментов, которые могут быть рассмотрены как мишени лекарственных препаратов [3].

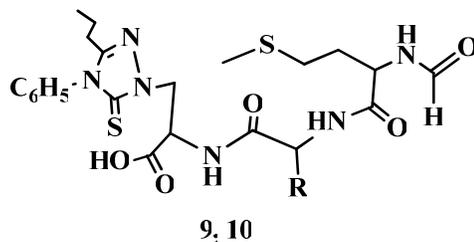
В настоящей работе описывается синтез пептидов с использованием оптически чистой небелковой гетероциклически замещенной аминокислоты и изучено влияние синтезированных пептидов на энзимы – трипсин и протеиназу К.

Синтез пептидов осуществлен методом активированных эфиров в растворе [4,5]. В качестве исходных соединений были использованы N-формил-(S)-метионин (**1**), глицин (**3**), (S)-аланин (**4**), а также синтетическая аминокислота – (S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин (**5**), полученный по известной методике [6].

На первой стадии с помощью дициклогексилкарбодиимида (DCC) из N-формил-(S)-метионина был получен его N-оксисукцинимидный (OSu) эфир (**2**), который далее конденсацией в щелочной водно-органической среде с аминокислотами был переведен в соответствующие дипептиды **6, 7, 8** (схема).



Трипептиды **8, 9** также были получены аналогично по вышеуказанной схеме без выделения промежуточного N-оксисукцинимидного эфира. Эта методика оказалась не только более удобной, но и более выгодной с точки зрения выхода продукта.



9. R=H, 10. R=CH₃,

Активность протеиназы К и трипсина определяли по известной методике, путем измерения количества свободных аминогрупп с помощью орто-фталальдегида (ОФА) [7]. Результаты показаны в таблице.

**Действие синтезированных пептидов на активность
протеиназы К и трипсина**

Соединение (5мМ)	Протеиназа К, %	Трипсин, %
		%
Контроль	100,0	100,0
(<i>S</i>)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланин	67,6	101,2
N-формил-(<i>S</i>)-метионил-(<i>S</i>)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланин	68,5	120,9
N-формил-(<i>S</i>)-метионилглицил-(<i>S</i>)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланин	73,7	76,7
N-формил-(<i>S</i>)-метионил-(<i>S</i>)-аланил-(<i>S</i>)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланин	122,3	99,4

Из данных таблицы видно, что при добавлении N-формил-(*S*)-метионил-(*S*)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланина (**8**) активность трипсина повышается, в то время как активность протеиназы К понижается. В случае N-формил-(*S*)-метионилглицил-(*S*)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланина (**9**) активность как протеиназы К, так и трипсина понижается. N-Формил-(*S*)-метионил-(*S*)-аланил-(*S*)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланин (**10**) не влияет на активность трипсина, но повышает активность протеиназы К.

Таким образом, показано, что гетероциклически замещенная аминокислота (*S*)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланин (**5**) в равной степени, как и дипептид – N-формил-(*S*)-метионил-(*S*)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланин (**6**), оказывают ингибирующее действие на протеиназу К, а трипептид N-формил-(*S*)-метионилглицил-(*S*)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланин (**9**), понижает активность как протеиназы К, так и трипсина.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹H регистрировались на приборе “Varian Mercury 300VX” с рабочей частотой 300.08 МГц в растворе ДМСО-*d*₆/CCl₄ 1/3 с использованием метода двойного резонанса. Оптическое вращение [α]_D²⁰ измеряли на поляриметре “Perkin Elmer-341”. ТСХ проводили на пластинках “Silufol UV-254” (проявитель – хлортолуидин).

Синтез N-формил-(S)-метионина (**1**) и его сукцинимидного эфира проводили по известной методике [8], а синтез (S)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланина – согласно методике [6].

Получение дипептидов 6,7,8. В плоскодонную колбу с магнитной мешалкой помещали 1.7 ммоль аланина, 2.5 мл 0.5 М раствора NaOH и 1.3 ммоль NaHCO₃. При комнатной температуре добавляли 1.8 ммоль сукцинимидного эфира N-формил-(S)-метионина в 5 мл диоксана и перемешивали реакционную смесь в течение 6 ч. На следующий день к содержимому колбы приливали 5 мл этилацетата, 2 мл 10% водного раствора лимонной кислоты и добавляли 0.2 г NaCl. После интенсивного перемешивания органический слой отделяли, водный экстрагировали этилацетатом (два раза по 10 мл). Объединенные органические фракции сушили безводным сульфатом натрия, декантировали и упарили в вакууме. Целевой продукт перекристаллизовывали из смеси этилацетат-гексан, фильтровали и высушивали под вакуумом при 50–60°C.

N-Формил-(S)-метионилглицин (6). Выход дипептида 68%, т.пл.= 130-131°C

N-Формил-(S)-метионил-(S)-аланин (7). Выход дипептида 55%, т.пл.= 138-140°C.

N-Формил-(S)-метионил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-(-аланин (8). Выход дипептида 48%, т.пл.= 140-141°C. Найдено, %: С 51.59; Н 5.85; N 15.04 C₂₀H₂₇N₅O₄S₂. Вычислено, %: С 51.24; Н 5.76; N 14.94. $[\alpha]_D^{20} = +35,34$ (с 0.78, СН₃ОН). Спектр ЯМР ¹H (DMSO, δ, м.д., Гц): 0.89 т (3H, J=7.4, CH₂CH₂CH₃); 1.55 скс. (2H, J=7.4, CH₂CH₂CH₃); 1.82 м и 1.97 м (2H, CH₂CH₂S); 2.06 с (3H, SCH₃); 2.33 – 2.50 м (4H, CH₂CH₂S и CH₂CH₂CH₃); 4.42 дд (1H, J₁=13.9, J₂=8.6, =NNCH₂); 4.44 тд (1H, J₁=8.4, J₂=5.4, CHONHCH); 4.62 дд (1H, J₁=13.9, J₂=5.0, =NNCH₂); 4.85 ддд (1H, J₁=8.6, J₂=8.0, J₃=5.0, NHCHCOOH); 7.37 м (2H, H-2,6 Ph); 7.48 – 7.59 м (3H, H-3,4,5 Ph); 7.99 м (1H, J=1.3, CHO); 8.07 дд (1H, J₁=8.4, J₂=1.3, NHCHO); 8.12 д (1H, J=8.0, NHCHCOOH); 12.69 ш (1H, COOH).

Получение трипептидов 9,10. В плоскодонную колбу с магнитной мешалкой помещали 2.6 ммоль (S)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланина в 3.75 мл 0.5 М водного раствора едкого натра (NaOH) и 1.9 ммоль пищевой соды (NaHCO₃). К полученному раствору при комнатной температуре добавляли 2.7 ммоль сукцинимидного эфира N-формил-(S)-метионилглицина или N-формил-(S)-метионилаланина в 10 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч и оставляли на ночь. На следующий день к реакционной смеси добавляли 12 мл этилацетата и 4.5 мл 10% раствора лимонной кислоты. После интенсивного перемешивания органический слой отделяли, а водный слой два раза экстрагировали этилацетатом (по 5 мл). Органический слой суши-

ли безводным сульфатом натрия и затем досуха отгоняли растворитель. Сухой остаток растворяли при нагревании в 5 мл этилацетата и оставляли на ночь. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали смесью этилацетат-гексан и сушили при температуре 50°C.

N-Формил-(S)-метионилглицил-(S)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланин (9). Выход 45%, т.пл.=109-110°C. Найдено, %: С 50.56; Н 5.78; N 16.08. C₂₂H₃₀N₆O₅S₂. Вычислено, %: С 50.39; Н 5.49; N 15.91. $[\alpha]_D^{20} = -6,6$ (с 0,5 CH₃OH). Спектр ЯМР¹H (DMSO, δ, м.д., ΓH): 0.90 (3H, т, J=7.4, CH₃Pr); 1.56 (2H, скс, J=7.4, CH₂ Pr); 1.82 и 1.98 (2H, м, CH₂CH₂S); 2.06 (3H, с, SCH₃); 2.34-2.48 (4H, м, CH₂CH₂S и CH₂ Pr); 3.72 (1H, дд, J₁=16.8, J₂=5.6, NHCH₂); 3.77 (1H, дд, J₁=16.8, J₂=5.6, NHCH₂); 4.36 (1H, дд, J₁=13.6, J₂=8.6, =NNCH₂); 4.46 (1H, тд, J₁=8.1, J₂=5.4, CHONHCH); 4.61 (1H, дд, J₁=13.6, J₂=5.1, =NNCH₂); 4.88 (1H, тд, J₁=8.3, J₂=5.1, NHCHCOOH); 7.36 (2H, м, C₆H₅); 7.48-7.59 (3H, м, C₆H₅); 7.98 (1H, д, J=8.3, NHCHCOOH); 8.02 (1H, д, J=1.4, CHO); 8.03 (1H, т, J=5.7, NHCH₂); 8.13 (1H, дд, J₁=8.2, J₂=1.4, NHCHO); 12.30 (1H, ш, COOH).

N-Формил-(S)-метионил-(S)-аланил-(S)-β-(4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланин (10): Выход 42%, т.пл.=149-150°C. Найдено, %: С 51.22; Н 6.04; N 15.63. C₂₃H₃₃N₆O₅S₂. Вычислено, %: С 51.22; Н 6.04; N 15.47. $[\alpha]_D^{20} = -31,37$ (с 0,198 CH₃OH). Спектр ЯМР¹H (DMSO, δ, м.д., ΓH): 0.90 (3H, т, J=7.4, CH₃ Pr); 1.28 (3H, д, J=7.1, CH₃CH); 1.55 (2H, сп, J=7.4, CH₂ Pr); 1.81 и 1.97 (2H, м, CH₂CH₂S); 2.05 (3H, с, SCH₃); 2.39-2.47 (4H, м, CH₂CH₂S и CH₂ Pr); 4.29 (1H, dq, J₁=7.5, J₂=7.1, CHCH₃); 4.39 (1H, дд, J₁=13.5, J₂=8.8, =NNCH₂); 4.44 (1H, ддд, J₁=9.0, J₂=7.5, J₃=5.0, CHONHCH); 4.58 (1H, дд, J₁=13.5, J₂=5.1, =NNCH₂); 4.83 (1H, ддд, J₁=8.8, J₂=8.1, J₃=5.1, NHCHCOOH); 7.35 (2H, м, C₆H₅); 7.48-7.59 (3H, м, C₆H₅); 7.86 (1H, д, J=7.5, NHCHCH₃); 7.92 (1H, д, J=8.1, NHCHCOOH); 8.02 (1H, д, J=1.6, CHO); 8.12 (1H, дд, J₁=8.4, J₂=1.6, NHCHO); 12.25 (1H, ш, COOH).

**(S)-β-(4-Ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ)-α-ալանինի շիսսը վրա N-
ֆորմիլի եվ ՏՐԻՊԵՊՏԻՆԵՐԻ ՄԻՆԹԵԶԸ
ԵՎ ՍԵՐԻՆԱՅԻՆ ՊՐՈՏԵԱԶԻՆԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ՆՐԱՆՑ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ
Տ. Հ. ՄԱՐԳՍՅԱՆ**

Սինթեզվել են նոր N-ֆորմիլի- և տրիպեպտիդներ էլնելով N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնինի և (S)-β-(4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ)-α-ալանինից:
Ուսումնասիրվել է սինթեզված պեպտիդների ազդեցությունը տրիպսինի և պրոտեինազ K-ի ակտիվության վրա: Հաստատվել է, որ դիպեպտիդ N-ֆորմիլ-(S)-մեթիոնինիլ-(S)-β-(4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ)-α-ալանինը ունի արգելակող ազդեցություն պրոտեինազ K-ի ակտիվությանը վրա, իսկ տրիպեպտիդ N-ֆորմիլ-(S)-

մեթիննիլզիլ- (S) - β -(4-ֆենիլ-3-պրոպիլ-5-թիօքսո-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ)- α -ալանինը իջեցնում է
ինչպես պրոտեինազ K-ի, այնպես էլ տրիպսինի ակտիվությունը:

SYNTHESIS OF N-FORMILDI- AND TRIPEPTIDES BASED ON (S) - β -(4-PHENYL-3-PROPYL-5-THIOXO-1,2,4-TRIAZOL-1-YL)- α -ALANINE AND STUDY OF THEIR INFLUENCE ON ACTIVITY OF SERINE PROTEASES

T. O. SARGSYAN

Scientific and Production Center "Armbiotechnology" NAS RA
14, Gyurjyan Str., Yerevan, 0056, Armenia
Fax(37410) 654183 E-mail: sagysu@netsys.am

New N-formyldi- and tripeptides containing heterocycle-substituted non-protein amino acid (S) - β -(4-phenyl-3-propyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl)- α -alanine were synthesized in the solution by the method of activated esters.

The influence of peptides on activity of trypsin and proteinase K has been studied. It was shown that dipeptide N-formyl- (S) - β -(4-phenyl-3-propyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl)- α -alanine had an inhibiting action on proteinase K, and tripeptide N-formyl- (S) -methionylglycyl- (S) - β -(4-phenyl-3-propyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl)- α -alanine decreased activity of both proteinase K and trypsin.

ЖИТЕПАТЫПА

- [1] Boldyrov A., Bulygina E., Leinsoo T., Petrushanko I., Tsubone S., Abe H. // J. Compar. Biochem. and Phys., 2004, v. 137(1), p. 81.
- [2] Hovhannisyan N., Harutyunyan Sh., Hovhannisyan A., Hambardzumyan A., Chitchyan M., Melkumyan M., Oganosova G., Avetisyan N. // Amino Acids., 2009, v. 37(3), p. 531.
- [3] Smith T., Stanley C. // Trends in Biochemistrty, 1970, v. 33(11), p. 557.
- [4] Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M. // Ibid., №63, v. 85, №№, p. 3039.
- [5] Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M. // J. Amer. Chem. Soc., №64, v. 86, №9, p. №39.
- [6] Saghyan A.S., Geolchanyan A.V., Petrosyan S.G., Chochikyan T.V., Haroutyunyan V.S., Avetisyan A.A., Belokon' Yu.N., Fisher K. // Tetrahedron: Asymmetry, 2004, v. №, p. 705.
- [7] Gaade W., Brown J. // Biochemica and Biophysica Acta, №8№v. №, №№p. 86.
- [8] Danghyan Yu.M., Sargsyan T.H., Gjamgaryan S.M., Gyulumyan E.A., Panosyan H.A., Saghyan A.S. // Chem. J. of Armenia, 20№, v. 63, №3, p. 385.