

**СИНТЕЗ НОВЫХ ДИПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
4,5,6,7-ТЕТРАГИДРОБЕНЗОТИОФЕНСОДЕРЖАЩИХ АНАЛОГОВ
(S)- α -АЛАНИНА**

Е. И. АКОПЯН

Научно-производственный центр "Армбиотехнология"
НАН Республики Армения
Армения, 0056 Ереван, ул. Гюрджяна, 14
Факс: (374-10)654183 E-mail: armbiotech@gmail.com

Поступило 19 III 2019

Осуществлен синтез новых дипептидов с использованием *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-(S)-аланина и энантиомерно чистых небелковых аминокислот – (S)- β -(3'-карбамоил)- и (S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланинов. Пептидный синтез осуществлен методом активированных эфиров.

С помощью программы "Пасс-онлайн" проведено выявление возможных биологических свойств ряда пептидов, содержащих небелковые аминокислоты: (S)- β -(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин и (S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин. Показано, что они могут проявлять различную биологическую активность в зависимости от конкретной структуры молекулы. Все рассмотренные пептиды, по всей вероятности, могут быть ингибиторами ряда ферментов. Но лучшие результаты показали *N*-t-BOC-(S)-аланил-(S)- β -(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин и *N*-t-BOC-(S)-аланил-(S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин. Например, *N*-t-BOC-(S)-аланил-(S)- β -(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин является потенциальным ингибитором протеин-глутаматметилэстеразы, а *N*-t-BOC-(S)-аланил-(S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин – тиольной протеазы.

В результате разработаны условия синтеза новых дипептидов – *N*-t-BOC-(S)-аланил-(S)- β -(3'-карбамоил)- и *N*-t-BOC-(S)-аланил-(S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланинов.

Табл. 1, библиографических ссылок 11.

Уже более 70 лет проводятся исследования в области синтеза и изучения пептидов, а также возможности их внедрения в медицинскую

практику [1]. Согласно литературным данным, на сегодняшний день насчитывается более 750 синтетических пептидных препаратов, из которых 60 зарегистрированы как лекарственные препараты, 150 находятся на стадии клинических испытаний, а 500 синтетических пептидов – на доклинической стадии испытаний. Следует отметить, что большинство из них содержит небелковые аминокислотные остатки [2]. Пептиды, содержащие небелковые аминокислоты, легко преодолевают все барьеры, вплоть до гематоэнцефалического. При этом субстрат труднее распознается со стороны ферментов, что значительно затрудняет протеолиз и увеличивает время действия препарата [3]. Эти и другие свойства пептидов, содержащих фрагмент небелковой аминокислоты, позволяют создавать на их основе физиологически и фармакологически активные препараты [4].

В настоящее время широко используются различные компьютерные программы, с помощью которых возможно моделирование биологически активных молекул и прогнозирование свойств многочисленных органических молекул с известными структурами. Одной из таких программ является программа “Пасс-онлайн”, использованная нами для выявления спектра вероятной биологической активности новых пептидов [5]. Затем, основываясь на прогнозах, выбирают потенциально фармакологически активное соединение, проводят целевой синтез и исследуют спрогнозированную активность экспериментальным путем, что часто приводит к обнаружению нового биологически активного соединения.

Учитывая широкий спектр биологических свойств пептидов, мы сочли актуальным с помощью компьютерной программы ПАСС-онлайн изучить спектр возможных биологических активностей дипептидов, содержащих аминокислоты (S)- β -(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин (**3**) и (S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин (**4**). Программа “Пасс-онлайн” является вспомогательным инструментом для оценки общего биологического потенциала органических лекарствовподобных молекул. Она дает возможность прогнозировать более чем 3500 видов активностей, включая фармакологические эффекты, механизмы воздействия, токсические и побочные эффекты, взаимодействие с метаболическими ферментами и транспортерами, воздействие на экспрессию генов и т.д. Для получения спектра биологической активности данного вещества достаточно иметь только структурную формулу. Таким образом, предсказание возможно и для соединений, которые еще не синтезированы. Результаты прогноза выдаются в виде списка названий вероятных видов активностей с расчетными оценками вероятностей наличия (Pa) и отсутствия (Pi) со значением от 0 до 1. Pa (probability "to be active") оценивает вероятность принадлежности изучаемого соединения к субклас-

су активных соединений на основе схожести структуры с теми молекулами, которые являются наиболее типичными в данном субнаборе «активные». P_i (probability "to be inactive") оценивает вероятность принадлежности изучаемого соединения к субклассу неактивных соединений.

С помощью Пасс-онлайн прогнозировалось более 20 (S)- β -(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензо-тифен-2-ил-карбамоил)- α -аланин-(3) и (S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин (4) содержащих дипептидов, из которых наиболее активные приведены в таблице.

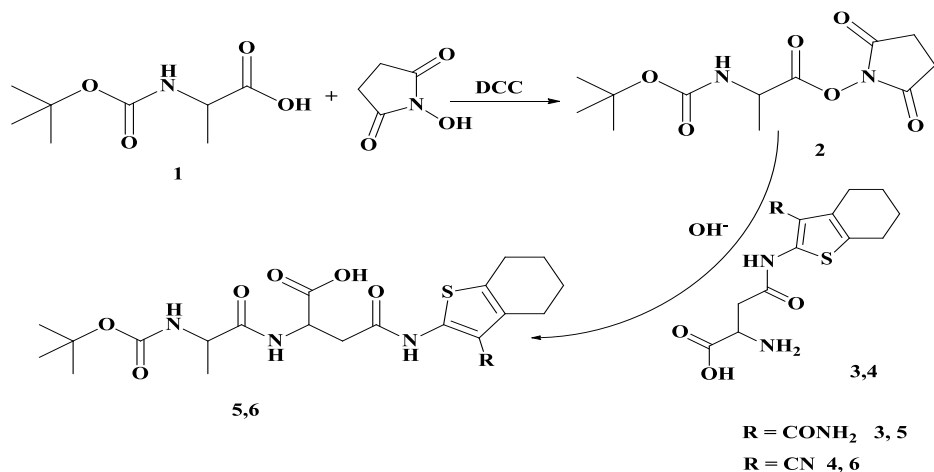
Как видно из таблицы, все изученные пептиды, по всей вероятности, могут быть ингибиторами ряда ферментов. Но лучшие результаты показали N-t-BOC-(S)-аланил-(S)- β -(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин и N-t-BOC-(S)-аланил-(S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин. Так, N-t-BOC-(S)-аланил-(S)- β -(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин является потенциальным ингибитором протеинглутаматметилэстеразы, а N-t-BOC-(S)-аланил-(S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин – ингибитором тиольной протеазы.

Исходя из вышеизложенного, нам представлялось актуальным осуществить синтез пептидов, содержащих N-*трет*-бутилоксикарбонил-(S)-аланильный фрагмент (1) и β -гетероциклически замещенные аминокислоты (S)- β -(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин (3) и (S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин (4). Последние были получены методом асимметрического синтеза и обладали высокой оптической чистотой (более 98%), что, в свою очередь, предоставляло возможность отследить наличие или отсутствие рацемизации при получении конкретного пептида [6].

Для синтеза пептидов нами был применен метод активированных эфиров в растворе, отличающийся простотой, а это при стабильности продуктов реакции позволяет получать желаемые продукты с хорошими выходами и высокой чистотой [7,8].

На первой стадии с помощью N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC) из BOC-(S)-аланина (1) был получен его достаточно устойчивый сукцинимидный эфир (2), который далее в щелочной водно-органической среде конденсируется с небелковыми аминокислотами (3,4) с образованием соответствующих дипептидов (5,6).

Схема



В результате нами получены новые производные дипептидов, содержащих небелковые гетероциклические аминокислоты. Их структура была подтверждена методом ЯМР ^1H спектроскопии. При синтезе дипептидов рацемического продукта не обнаружено, что позволяет предложить метод активированных эфиров для синтеза оптически чистых пептидов, содержащих гетероциклические небелковые аминокислоты.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H снимали на приборе “Mercury-300” Varian (300 МГц) в растворе $\text{DMSO}-d_6/\text{CCl}_4$ 1/3 с использованием метода двойного резонанса. ТСХ проводили на пластинках “Silufol UV-254” в смеси хлороформ-этилацетат-метанол (4:3:1), проявитель – хлортолуидин.

Элементный анализ проводили на элементном CNS-O анализаторе “Euro EA 3000”.

Синтез *N*-*tert*-бутилоксикарбонил-(*S*)-аланина и соответствующих сукцинимидных эфиров осуществляли согласно методикам [9-11]. Оптически чистые небелковые аминокислоты были синтезированы нами в лаборатории асимметрического синтеза НПЦ “Армбиотехнология”.

Получение N-оксисукцинимидного эфира ВОС-(*S*)-аланина (2). К раствору 1.5 г (7.9 ммоль) ВОС-(*S*)-аланина и 0.95 г (8.2 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид в смеси 1.0 мл диоксана и 2.7 мл хлористого метилена при 0°C добавляли 1.75 г (8.5 ммоль) DCC, предварительно растворенного в 3 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0°C и оставляли на ночь в холодильнике. За ходом реакции следили методом ТСХ (хлороформ/этилацетат/метанол, 4:3:1). Образовавшийся

Некоторые вероятные биологические активности дипептидов, содержащих (S)-β-(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)-α-аланин и (S)-β-(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)-α-аланин

[illegible]

Продолжение таблицы

N-Fmoc-(S)-аланил-(S)- β -(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин	–	–	0.480	0.003	0.484	0.037	0.455	0.022	0.454	0.059	0.432	0.082	0.455	0.016
N-Fmoc-(S)-аланил-(S)- β -(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)- α -аланин	–	–	–	–	0.456	0.044	0.430	0.027	–	–	–	–	0.607	0.006

осадок отфильтровывали, фильтрат концентрировали под вакуумом до выпадения осадка, который кристаллизировывали из изопропилового спирта. Получили продукт (2) с выходом 70%, т.пл. 148-150°C [9].

Получение ВОС-(S)-аланил-(S)-β-(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)аланина (5). В плоскодонную колбу с магнитной мешалкой помещали 0.211 г (0.769 ммоль) (S)-β-(3'-карбамоил-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)аланина, 1.43 мл 0.5 М раствора едкого натра и 0.039 г (0.468 ммоль) пищевой соды и нагревали на водяной бане при 60°C до растворения аминокислоты. Затем при комнатной температуре добавляли 0.2 г (0.699 ммоль) сукцинимидного эфира ВОС-(S)-аланина в 2 мл диоксана, перемешивали реакционную смесь в течение 3 ч и оставляли на ночь в холодильнике при температуре 5°C. На следующий день в содержимое колбы добавляли 5 мл этилацетата, 2.6 мл 10% лимонной кислоты и 0.3 г хлористого натрия. После интенсивного перемешивания в течение 15 мин органический слой отделяли и упаривали растворитель в вакууме при 50°C. Дипептид кристаллизировывали из раствора этилацетата и спирта. Выход 74% (0.25 г, 0.519 ммоль), т.пл. 188-190°C. Найдено, %: С 52.10; Н 6.09; N 11.48. C₂₁H₃₀N₄O₇S. Вычислено, %: С 52.27; Н 6.27; N 11.61. Спектр ЯМР ¹H (DMSO/CCl₄, δ, м.д., Гц): 1.20 (0.6 Н, д, J = 7.2, CH₃); 1.23 (2.4 Н, д, CH₃); 1.38 (1.8 Н, с, C(CH₃)₃); 1.40 (7.2 Н, с, C(CH₃)₃); 1.75-1.86 (4Н, м, (CH₂)₂, C₆H₈); 2.65 (2Н, м); 2.72 (2Н, м, (CH₂)₂, C₆H₈); 2.90 (2Н, д, J = 5.7, CH₂CH); 3.96-4.08 (1Н, м, CHCH₃); 4.56-4.64 (1Н, м, CHCH₂); 6.36 (1Н, br. д, J = 7.2, NH); 6.90 (2Н, br., NH₂); 7.92 (1Н, br., д, J = 7.2, NH); 11.76 (0.8Н, br.) и 11.81 (0.2Н, br., NH).

Получение ВОС-(S)-аланил-(S)-β-(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)аланина (6). В плоскодонную колбу с магнитной мешалкой помещали 0.169 г (0.575 ммоль) (S)-β-(3'-циано-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-2-ил-карбамоил)аланина, 1.07 мл 0.5 М раствора едкого натра и 0.014 г (0.167 ммоль) пищевой соды и нагревали до растворения аминокислоты. Затем при комнатной температуре добавляли 0.15 г (0.523 ммоль) сукцинимидного эфира ВОС-(S)-аланина в 1.5 мл диоксана, перемешивали реакционную смесь в течение 3 ч и оставляли на ночь в холодильнике при температуре 5°C. На следующий день в содержимое колбы добавляли 5 мл этилацетата, 2 мл 10% лимонной кислоты и 0.2 г хлористого натрия. После интенсивного перемешивания в течение 15 мин органический слой отделяли и упаривали растворитель в вакууме при 50°C. Дипептид выделяли растиранием в гексане. Выход 82% (0.2 г, 0.431 ммоль), т.пл. 180-182°C. Найдено, %: С 54.10; Н 59.95; N 12.01. C₂₁H₂₈N₄O₆S. Вычислено, %: С 54.30; Н 6.08; N 12.06. Спектр ЯМР ¹H (DMSO/CCl₄, δ, м.д., Гц): 1.23 (3 Н, д, J = 7.2, CH₃); 1.39 (9Н, с, CH₃); 1.77-1.87 (4Н, м, (CH₂)₂, C₆H₈); 2.52-2.62 (4Н, м, (CH₂)₂, C₆H₈); 2.92 (1Н, дд, J = 16.0, 6.3, CH₂CH); 3.02 (1Н, дд, J = 16.0,

5.6, CH_2CH); 3.94-4.07(1H, m, CHCH_3); 4.57 (1H, dd, $J = 7.6, 6.3, 5.6$, CHCH_2); 6.37 (1H, br. d, $J = 7.8$, NHCH); 7.85 (1H, br. d, $J = 7.5$, NHCH); 11.46 (1H, br. C, NH) и br. COOH .

4,5,6,7-ՏԵՏՐԱՀԻԴՐՈՔՆԵՆԶՈԹԻՓԵՆ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ (S)- α -ԱԼԱՆԻՆԻ ԱԾԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ ԿԻՐԱՍՄԱՄԲ ՆՈՐ ԴԻՊԵՊՏԻԴՆԵՐԻ ՍԻՆԹԵԶ

Ն. Ի. ՀԱԿՈԲՅԱՆ

N-Տրետ-բուտիլօքսիկարբոնիլ-(S)-ալանին ամինաթթվի և էնանթիոմերապես մաքուր ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ (S)- β -(3'-կարբամոիլ)- և (S)- β -(3'-ցիանո-4,5,6,7-տետրահիդրոբենզոթիոֆեն-2-իլ-կարբամոիլ)- α -ալանինի հիման վրա սինթեզվել են նոր դիպեպտիդներ: Պեպտիդների սինթեզն իրականացվել է ակտիվացված եթերների եղանակով:

«Պասս օնլայն» համակարգչային ծրագրի օգնությամբ իրականացվել է (S)- β -(3'-կարբամոիլ-4,5,6,7-տետրահիդրոբենզոթիոֆեն-2-իլ-կարբամոիլ)- α -ալանին և (S)- β -(3'-ցիանո-4,5,6,7-տետրահիդրոբենզոթիոֆեն-2-իլ-կարբամոիլ)- α -ալանին պարունակող մի շարք պեպտիդների հնարավոր կենսաբանական հատկությունների բացահայտում: Ցույց է տրվել, որ նրանք կարող են ցուցաբերել մի շարք կենսաբանական հատկություններ կախված մոլեկուլի կառուցվածքից: Բոլոր հետազոտված պեպտիդները, ամենայն հավանականությամբ, կարող են հանդիսանալ մի շարք ֆերմենտների արգելակիչներ, բայց լավագույն արդյունք են ցուցաբերել *N*-*t*-BOC-(S)-ալանիլ-(S)- β -(3'-կարբամոիլ-4,5,6,7-տետրահիդրոբենզոթիոֆեն-2-իլ-կարբամոիլ)- α -ալանինը և *N*-*t*-BOC-(S)-ալանիլ-(S)- β -(3'-ցիանո-4,5,6,7-տետրահիդրոբենզոթիոֆեն-2-իլ-կարբամոիլ)- α -ալանինը:

Օրինակ, *N*-*t*-BOC-(S)-ալանիլ-(S)- β -(3'-կարբամոիլ-4,5,6,7-տետրահիդրոբենզոթիոֆեն-2-իլ-կարբամոիլ)- α -ալանինը հանդիսանում է պրոտեինգլոտամատմիթիլէսթերազի պոտենցիալ արգելակիչ, իսկ *N*-*t*-BOC-(S)-ալանիլ-(S)- β -(3'-ցիանո-4,5,6,7-տետրահիդրոբենզոթիոֆեն-2-իլ-կարբամոիլ)- α -ալանինը թիոլային պրոտեազի:

Արդյունքում մշակվել են նոր դիպեպտիդներ *N*-*t*-BOC-(S)-ալանիլ-(S)- β -(3'-կարբամոիլ)- և *N*-*t*-BOC-(S)-ալանիլ-(S)- β -(3'-ցիանո-4,5,6,7-տետրահիդրոբենզոթիոֆեն-2-իլ-կարբամոիլ)- α -ալանինի սինթեզի պայմաններ:

SYNTHESIS OF NEW DIPEPTIDES USING 4,5,6,7-TETRAHYDROBENZOTHIOPHENE-CONTAINING ANALOGS OF (S)- α -ALANINE

H. I. HAKOBYAN

Scientific and Production Center "Armibiotechnology" NAS RA

14, Gyurjyan Str., Yerevan, 0056, Armenia

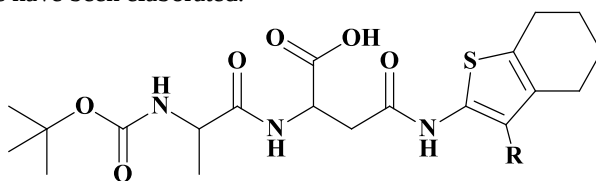
Fax: (374-10) 654183 E-mail: armibiotech@gmail.com

New dipeptides were synthesized using *N*-*tert*-butyloxycarbonyl-(S)-alanine and enantiomerically pure non-protein amino acids - (S)- β -(3'-carbamoyl)- and (S)- β -(3'-cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophen-2-yl-carbamoyl)- α -alanine. The peptide synthesis was conducted by the method of activated ethers.

Detection of the possible biological properties of a number of peptides containing non-protein amino acids (S)- β -(3'-carbamoyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophen-2-yl-carbamoyl)- α -alanine and (S)- β -(3'-cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophen-2-yl-

carbamoyl)- α -alanine was carried out by the “Online Pass” program. It was shown that they could have different biological activity depending on the specific structure of the molecule. All considered peptides are likely to be inhibitors of a number of enzymes. But the best results showed N-t-BOC-(S)-alanyl-(S)- β -(3'-carbamoyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophen-2-yl-carbamoyl)- α -alanine and N-t-BOC-(S)-alanyl-(S)- β -(3'-cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophen-2-yl-carbamoyl)- α -alanine. For example, N-t-BOC-(S)-alanyl-(S)- β -(3'-carbamoyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophen-2-yl-carbamoyl)- α -alanine is a potential inhibitor of protein-glutamate methylesterase but N-t-BOC-(S)-alanyl-(S)- β -(3'-cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophen-2-yl-carbamoyl)- α -alanine - of thiol protease.

As a result, the conditions for the synthesis of new dipeptides – N-t-BOC-(S)-alanyl-(S)- β -(3'-carbamoyl)-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophen-2-yl-carbamoyl)- α -alanine and N-t-BOC-(S)-alanyl-(S)- β -(3'-cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophen-2-yl-carbamoyl)- α -alanine have been elaborated.



R = CONH₂ and CN

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Sewald N., Jakubke H.-D. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Second, Revised and Updated Edition, 2009, p. 587.
- [2] Vlieghe P., Lisowski V., Martinez J. Khrestchatisky M. // Drug discovery today, 2009, v. 15, №1-2, p 40. <https://www.researchgate.net/publication/38058216>
- [3] Gregory A. Grant Synthetic peptides Oxford University Press, Second edition, 2002.
- [4] Hughes A. // WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim., v. 4. Protection Reactions, Medicinal Chemistry & Combinatorial Synthesis, 2011, v. 4, p. 538.
- [5] Veselovsky A.V., Ivanov A.S. // Design. Current Drug Targets – Infectious Disorders., 2003, v. 3, issue 1, p. 33.
- [6] Сагиян А.С., Акопян Е.И., Геолчянян А.В., Дадаян С.А., Пароникян Е.Г., Норавян А.С., Паносян Г.А. // Хим. ж. Армении, 2010, т. 63, №3, с. 340.
- [7] Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M. // Ibid., 1963, v. 85, №19, p. 3039.
- [8] Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M. // J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, №9, p. 1839.
- [9] Позднеев В.Ф. // Химия природных соединений, 1974, №6, с. 764.
- [10] Дангян Ю.М., Саргсян Т.О., Джамгарян С.М., Гюлумян Э.А., Паносян Г.А. Сагиян А.С. // Хим. ж. Армении, 2010, т. 63, №3, с. 385.
- [11] Дангян Ю.М., Саргсян Т.О., Джамгарян С.М., Гюлумян Э.А., Паносян Г.А. Сагиян А.С. // Хим. ж. Армении, 2010, т. 63, №1, с. 95.