

М. В. Шевчук, В. Ю. Танчук, Л. А. Кононець, І. Б. Кулік,  
А. В. Рибаківа, В. Д. Романенко, А. Є. Сорочинський,  
член-кореспондент НАН України А. І. Вовк,  
академік НАН України В. П. Кухар

## Бензо[d][1,3]діоксолвмісні похідні $\alpha$ -амінофосфонових кислот: синтез та інгібування протеїнтирозинфосфатаз

*Синтезовано бензо[d][1,3]діоксолвмісні похідні  $\alpha$ -амінофосфонових кислот загальної формули  $\text{HCO}_2\text{CH}(\text{R}^2)\text{N}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CH}(\text{R}^1)\text{PO}_3\text{H}_2$ , де  $\text{R}^1 = \text{Ph}$ ,  $4\text{-CF}_3\text{C}_6\text{H}_4$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CHF}_2(\text{CF}_2)_5$ ;  $\text{R}^2 = \text{бензо}[d][1,3]\text{діоксол-5-іл}$ ,  $\text{тіофен-2-іл}$ , і досліджено їх активність щодо протеїнтирозинфосфатази з ерсинії,  $\beta$ -протеїнтирозинфосфатази та протеїнтирозинфосфатази 1В як мішеней для потенційних лікарських засобів. Результати виконаних досліджень показують перспективність бензо[d][1,3]діоксолвмісних похідних  $N$ -фосфонометилгліцину як інгібіторів РТР1В та забезпечують підґрунтя для їх подальшої структурної оптимізації.*

Фосфонові та амінофосфонові кислоти в цілому і похідні  $N$ -фосфонометилгліцину зокрема можуть виявляти біологічну активність в модельних системах і успішно використовуються як лікарські препарати для лікування ряду захворювань [1, 2]. Останнім часом вони все частіше застосовуються як структурна основа для конструювання потенційно біоактивних сполук, направлених на терапевтично важливі ферменти та інші білки. Модифікація органічних сполук бензо[d][1,3]діоксол-5-ільним фрагментом, який зустрічається у складі біоактивних природних сполук [3, 4], успішно використовується в процесі пошуку протиракових препаратів [4], а також інгібіторів деяких ферментів [5]. Тому метою нашого дослідження стала розробка методу синтезу бензо[d][1,3]діоксолвмісних похідних  $N$ -фосфонометилгліцину і аналіз їх активності в модельних системах по відношенню до деяких фосфатаз. Пошук і конструювання інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз є актуальним у зв'язку з тим, що ці ферменти є перспективними мішенями для потенційних лікарських засобів. В тканинах людини протеїнтирозинфосфатази регулюють ріст, диференціацію, метаболізм, рухливість та інші функції клітин [6]. Зміна активності протеїнтирозинфосфатаз спричиняє зсув динамічної рівноваги на стадіях фосфорилування-дефосфорилування білкових субстратів. У випадку протеїнтирозинфосфатази 1В (РТР1В) і  $\beta$ -протеїнтирозинфосфатази (РТР $\beta$ ) ця зміна асоціюється з розвитком багатьох захворювань, у тому числі ожиріння, раку і діабету 2-го типу [7]. Встановлено, що внутрішньоклітинна РТР1В залучена до дефосфорилування рецепторів інсуліну і розглядається як негативний регулятор передачі інсулінового сигналу [8].

Похідні  $N$ -фосфонометилгліцину **4а-д** були одержані за розробленою нами раніше схемою [9]. Вихідні амінофосфонати **2а-г** синтезовані шляхом приєднання діетилфосфіту до відповідних імінів за реакцією Кабачника-Філдса в присутності ефірату трифтористого бору в дихлорометані при 0 °С (сполуки **2а**, **2б**) або при нагріванні до 80 °С без розчинника (сполуки **2в**, **2 г**).

Ключовим етапом синтезу була трикомпонентна реакція за участю амінофосфонатів, боронових кислот і гліоксилової кислоти, у результаті якої після хроматографічного очи-

щення одержано фосфонові ефіри **3а-д** з виходами 31–88%. Трансциліування за допомогою триметилбромосилану в присутності *смм*-колідину в ацетонітрилі при 20 °С з наступним гідролізом силлових ефірів привело до утворення фосфонових кислот **4а-д** (схема 1).

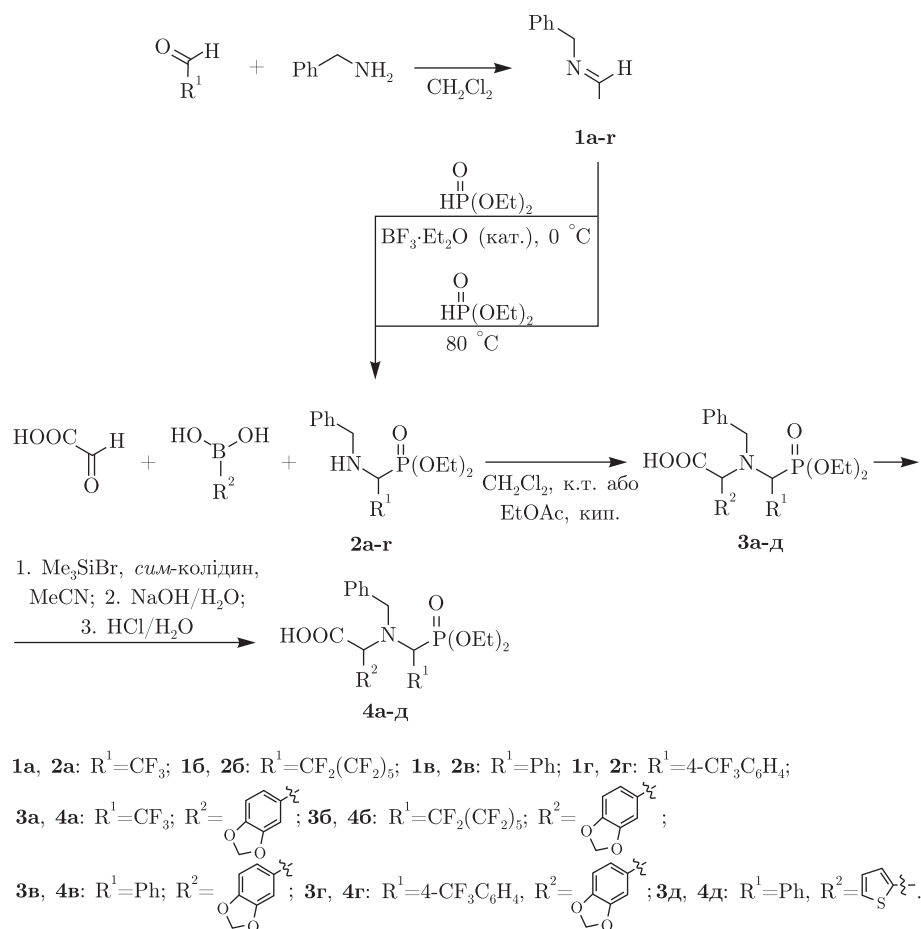


Схема 1. Синтез похідних *N*-фосфометилгліцину

Активність протеїнтирозинфосфатази з єрсинії (YOP) і РТРβ визначали в присутності модельного субстрату — *n*-нітрофенілфосфату. Отримані результати свідчать про те, що в присутності 150 мкМ сполуки **4а** активність РТРβ і YOP практично не змінювалась, проте введення поліфторалкільного замісника замість трифторметильної групи біля α-вуглецевого атома фосфонові кислоти (сполука **4б**) спричиняло інгібування ферменту на 20 і 25% відповідно. Подальше зростання інгібуючої здатності спостерігалось при використанні похідної **4в** з фенільним фрагментом біля α-вуглецевого атома. Значення  $\text{IC}_{50}$  інгібування РТРβ становило 84 мкМ, а для YOP — зменшувалося до 41 мкМ. Однак структурна модифікація фосфонові кислоти **4в** шляхом заміни фенільної групи на 4-трифторметилфенільну групу (сполука **4г**) спричиняла повну втрату інгібуючих властивостей щодо РТРβ і YOP. Ці дані вказують на можливу специфічну роль фенільного замісника біля α-вуглецевого атома фосфонові кислоти **4в** у процесі зв'язування ферментом. При цьому очевидно, що істотний внесок у спорідненість похідної **4в** до РТРβ і YOP здійснює також бензо[*d*][1,3]діоксол-5-ільний фрагмент інгібітора, оскільки структурно подібна сполука **4д** з тіофен-2-ільним замісником мала значно нижчу афінність.

Для визначення інгібуючої здатності похідної *N*-фосфонометилгліцину **4в** щодо РТР1В людини використовували фосфорильований декапептидний субстрат, Thr-Arg-Asp-Пеп-Тур[PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>]-Glu-Thr-Asp-Тур-Тур-Arg-Lys, що моделює структуру фрагмента інсуліну в межах амінокислотних залишків від 1142 до 1153. За умов дослідів значення IC<sub>50</sub> інгібування РТР1В становило 23 мкМ. Варто відзначити також певну селективність сполуки **4в** щодо РТР1В, оскільки її вплив на ΥОР і РТРβ був меншим і зовсім не спостерігався у випадку людської протеїнтирозинфосфатази LAR та неспецифічної лужної фосфатази з плаценти людини, що може виявляти властивості протеїнтирозинфосфатази.

Для оцінки афінності та аналізу способів зв'язування можливих діастереомерних структур інгібітора **4в** було застосовано метод молекулярного докінгу з використанням програми QXP/FLO<sup>+</sup> в режимі Fulldock+. Модель зв'язування конструювалася автоматично на основі кристалічної структури РТР1В згідно з даними RSCB Protein Data Bank (PDB код: 1NL9), вибраної на підставі результатів попереднього аналізу ряду PDB-файлів. Структури інгібіторів, що формували комплекси з ферментом, мали моноаніонні форми фосфорильного залишку та іонізовану карбоксильну групу.

У табл. 1 подано результати докінгу діастереомерів інгібітора **4в**. Видно, що діастереомерні форми (1*R*,2*S*)-**4в** і (1*S*,2*S*)-**4в** мають кращу комплементарність до активного центру РТР1В у порівнянні з іншими ізомерними структурами цього інгібітора.

За допомогою аналізу взаємодій діастереомерних форм інгібітора **4в** з РТР1В було виявлено, що всі вони зв'язуються з ферментом, орієнтуючись фосфонатною групою в напрямі до каталітичного залишку Cys215. Комплексоутворення (1*R*,2*S*)-**4в**, одного з двох імовірних продуктів виконаного синтезу, супроводжується утворенням водневих зв'язків за участю фосфорильного залишку і фрагментів Cys215, Ser216, Ala217, Glu220 і Arg221, що формують Р-петлю, а також за участю іонізованої карбоксильної групи та Arg221 і Glu266. При цьому гідрофобний бічний ланцюг Lys120 наближений до бензо[*d*][1,3]діоксольного фрагмента інгібітора, а Тур46 може забезпечувати стекінг-взаємодії з фенілом біля α-вуглецевого атома в молекулі інгібітора (рис. 1, *a*). Незважаючи на те що фосфорильний фрагмент і С(α)-фенільна група діастереомеру (1*S*,2*R*)-**4в** розташовані подібним чином, його карбоксильна група орієнтована назовні і тому не задіяна у фіксації цього діастереомеру, а Lys120 не бере участі в його зв'язуванні.

Аналіз даної моделі (див. рис. 1, *b*) вказує на те, що для цієї структури є можливі внутрішньомолекулярні взаємодії між фенілом бензильного замісника та ароматичним кільцем бензо[*d*][1,3]діоксольного фрагмента інгібітора, а сама молекула орієнтується в напрямі до WPD-петлі, не досягаючи, однак, тісного контакту. Розташування розглянутих діастереомерів інгібітора **4в** в активному центрі РТР1В подано на рис. 1, *в*, *г*. Окремо треба зазначити, що у випадку (1*S*, 2*S*)-**4в** фосфорильний залишок знаходиться на порівняно більшій віддалі від Cys215, і при цьому атом кисню бензо[*d*][1,3]діоксольного

Таблиця 1. Результати докінгу діастереомерів інгібітора **4в** в активний центр РТР1В

Структура інгібітора	p <i>K</i> <sub>i</sub>	Δ <i>E</i> <sub>doc</sub> , кДж/моль	Δ <i>E</i> <sub>Нбnd</sub> , кДж/моль	Δ <i>E</i> <sub>Сntc</sub> , кДж/моль
(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )- <b>4в</b>	4,9	-28,1	-72,2	-15,0
(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )- <b>4в</b>	4,4	-25,1	-74,0	-6,3
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )- <b>4в</b>	4,6	-26,3	-60,7	-10,5
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )- <b>4в</b>	5,5	-31,1	-67,1	-13,8

Примітка. Δ*E*<sub>Нбnd</sub> — внесок водневих зв'язків; Δ*E*<sub>Сntc</sub> — внесок контактних взаємодій в енергію докінгу.

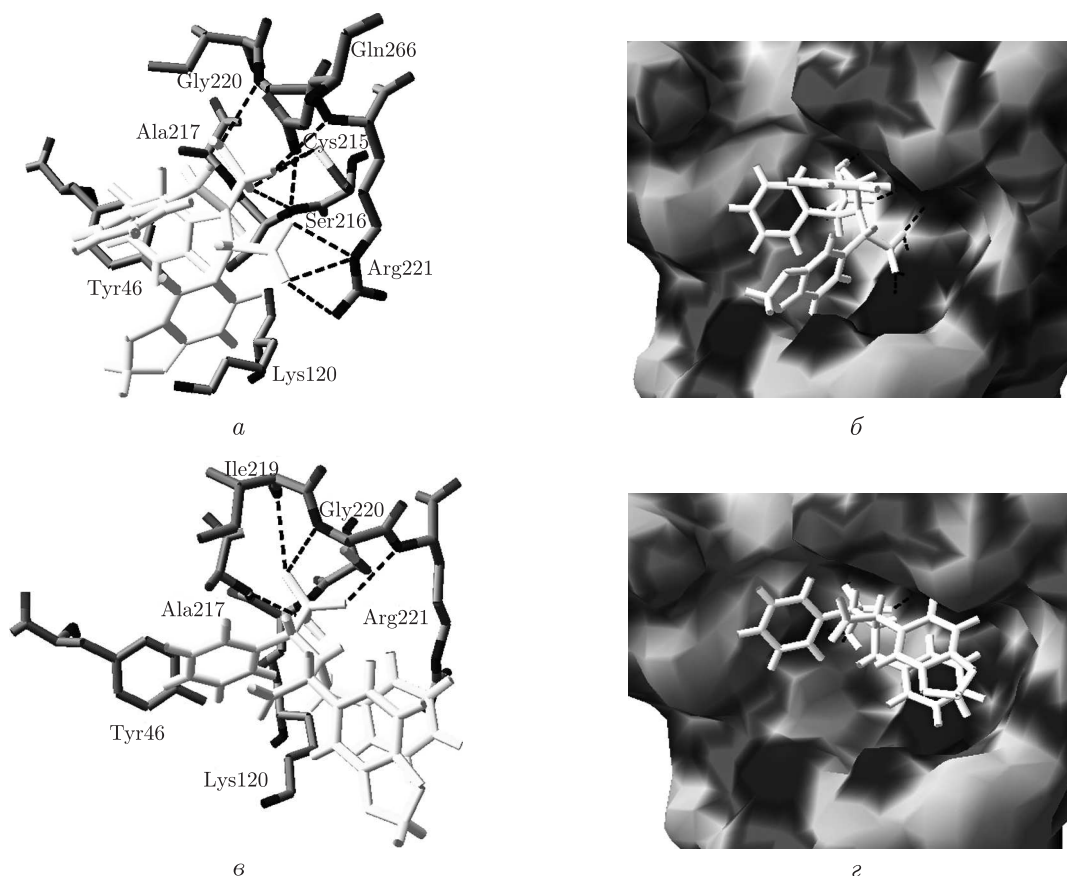


Рис. 1. Можливі способи зв'язування і розташування  $(1R,2S)$ -**4в** (а, е) і  $(1S,2R)$ -**4в** (б, д) в активному центрі РТР1В. Штриховими лініями позначено водневі зв'язки

фрагмента інгібітора може утворювати водневий зв'язок з Gly183, що належить до WPD-петлі.

Таким чином, дослідження і результати комп'ютерного моделювання діастереомерних похідних *N*-фосфометилгліцину **4а-д** свідчать про можливу роль як фосфорильного залишку, так і карбоксильної групи в структурі інгібітора. Заслужують на увагу властивості діастереомеру  $(1R,2S)$ -**4в**, що також свідчать про роль бензо[*d*][1,3]діоксольного фрагмента та фенільного замісника біля  $\alpha$ -вуглецевого атома в механізмах фіксації інгібітора в активному центрі ферменту. Результати виконаних досліджень забезпечують підґрунтя для подальшої структурної оптимізації похідних *N*-фосфометилгліцину як інгібіторів РТР1В.

#### Експериментальна частина.

*2*-{*N*-[діетоксифосфорил(феніл)метил]-*N*-бензил}аміно-2-(бензо[*d*][1,3]діоксол-5-іл)оцтова кислота (**3в**) і амоній 2-{*N*-[діетоксифосфорил(феніл)метил]-*N*-бензил}аміно-2-(бензо[*d*][1,3]діоксол-5-іл)ацетат (**4в**). До розчину 333 мг амінофосфонату **2в** (1,00 ммоль) в 3 мл етилацетату додавали 92 мг гліоксилової кислоти моногідрату (1,00 ммоль), перемішували 10 хв і додавали 166 мг 3,4-метилendioксифенілборонової кислоти (1,00 ммоль). Суміш кип'ятили протягом 2 год, після чого розчинник упарювали на роторі. Одержували 450 мг сирого продукту, чистий діастереомер одержували кристалізацією з етилацетату.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  основного діастереомеру ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,00$  (т,  $J = 7$  Гц, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1,43 (т,  $J = 7$  Гц, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,66–3,75 (м, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,85–3,94 (м, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,99 (д,  $J = 14$  Гц, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{N}$ ), 4,18–4,27 (м, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 4,28 (д,  $J = 20$  Гц, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{N}$ ), 4,35–4,45 (м, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 4,49 (дд,  $J = 14$  Гц,  $J = 5$  Гц, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{N}$ ), 5,04 (с, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ), 5,85 (д,  $J = 7$  Гц, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 6,32 (с, 1H, Ar), 6,46 (д,  $J = 7$  Гц, 1H, Ar), 6,62 (д,  $J = 7$  Гц, 1H, Ar), 7,14 (д,  $J = 7$  Гц, 2H, Ar), 7,16–7,33 (м, 8H, Ar), 11,00 (уш. с., 1H,  $\text{COOH}$ ) м. ч. Спектр ЯМР  $^{31}\text{P}$  основного діастереомеру ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 23,8$  м. ч. Сполуку **4в** одержували з 127 мг амінофосфонату **3в** (0,25 ммоль) дією 300 мг *cis*-колідину (2,50 ммоль) і 380 мг триметилбромосилану (2,50 ммоль). Вихід фосфонової кислоти 30%. 35 мг кислоти обробляли метанольним розчином аміаку, упарювали на роторі і обробляли ефіром. Одержані кристали амонійної солі відфільтровували, промивали ефіром і сушили. Вихід 35 мг. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 3,65$  (д,  $J = 14$  Гц, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{N}$ ), 4,53 (д,  $J = 19$  Гц, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{N}$ ), 4,65 (с, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ), 5,51 (д,  $J = 14$  Гц, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{N}$ ), 5,79 (д,  $J = 20$  Гц, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 6,27 (с, 1H, Ar), 6,36 (д,  $J = 8$  Гц, 1H, Ar), 6,50 (д,  $J = 8$  Гц, 1H, Ar), 7,13 (с, 5H, Ar), 7,51 (с, 3H, Ar), 7,81 (с, 2H, Ar) м. ч. Спектр ЯМР  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 9,2$  (д,  $J = 20$  Гц) м. ч.

*Інгібування протеїнтирозинфосфатаз похідними N-фосфонометилгліцину 4а-д.* У роботі використовували препарат рекомбінантної протеїнтирозинфосфатази з ерсинії (YOP51\*) та препарати рекомбінантних РТР $\beta$  і РТР1 В людини (“Sigma”). Активність YOP і РТР $\beta$  визначали як описано раніше [10]. При дослідженні інгібування РТР1В реакційна суміш містила 50 mM Bis-Tris (pH = 7,2), 1,1 mM DTT, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM субстрат ([pTyr $^{1146}$ ]-фрагмент інсулінового рецептора 1142–1153). Реакцію розпочинали додаванням 40 нМ РТР1В, загальний об’єм системи становив 0,2 мл. Кожну пробу витримували 20 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 50 мкл малахітового зеленого, а потім ще 10 хв витримували при 37 °С, після чого додавали 0,25 мл бідистильованої води до остаточного об’єму 0,5 мл. Кількість неорганічного фосфату визначали, вимірюючи оптичну густину розчину при 620 нм. Значення IC $_{50}$  інгібування РТР $\beta$ , YOP і РТР1В були концентрацією сполуки, що тестувалася, яка після 5 хв реакції забезпечувала зниження активності ферменту на 50%. За умов дослідів значення  $K_m$  для РТР $\beta$  становило  $(1,0 \pm 0,1)$  mM, для YOP —  $(2,3 \pm 0,3)$  mM [10]. Значення  $K_m$  для РТР1В при використанні [pTyr $^{1146}$ ]-фрагмента інсулінового рецептора становило 0,17 mM [11].

*Дослідження виконано за підтримки фонду УНТЦ (проект № 5215) та Державного комітету України з питань науки, інновацій та інформації (договір М/107-2010).*

1. *Aminophosphonic and aminophosphinic acids: chemistry and biological activity* / Eds. V.P. Kukhar, H.R. Hudson. – New York: Wiley, 2000. – 621 p.
2. *Coxon F.P., Thompson K., Rogers M.J.* Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2006. – **6**. – P. 307–312.
3. *Řezanka T., Řezanka P., Sigler K.* Glycosides of benzodioxole-indole alkaloids from Narcissus having axial chirality // *Phytochemistry.* – 2010. – **71**. – P. 301–306.
4. *de Magalhães Moreira D.R., Leite A.C.L., Ferreira P.M.P. et al.* Synthesis and antitumour evaluation of peptidyl-like derivatives containing the 1,3-benzodioxole system // *Eur. J. Med. Chem.* – 2007. – **42**. – P. 351–357.
5. *Zhang Y.-N., Zhang W., Hong D. et al.* Oleanolic acid and its derivatives: New inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B with cellular activities // *Bioorg. Med. Chem.* – 2008. – **16**. – P. 8697–8705.
6. *Zhang Z.-Y.* Functional studies of protein tyrosine phosphatases with chemical approaches // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 2005. – **1754**, No 1–2. – P. 100–107.
7. *Zhang Z.-Y.* Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2001. – **5**, No 4. – P. 416–423.

8. Kasibhatla B., Wos J., Peters K. G. Targeting protein tyrosine phosphatase to enhance insulin action for the potential treatment of diabetes // *Curr. Opin. Invest. Drugs.* – 2007. – **8.** – P. 805–813.
9. Shevchuk M. V., Sorochinsky A. E., Khilya V. P., Romanenko V. D., Kukhar V. P. Utilization of Aminophosphonates in the Petasis Boronic Acid Mannich Reaction // *Synlett.* – 2010. – No 1. – P. 73–76.
10. Vovk A. I., Kononets L. A., Tanchuk V. Yu., Cherenok S. O., Drapailo A. B., Kalchenko V. I., Kukhar V. P. Inhibition of Yersinia protein tyrosine phosphatase by phosphonate derivatives of calixarenes // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – **20.** – P. 483–487.
11. Maccari R., Paoli P., Ottana R. et al. 5-Arylidene-2,4-thiazolidinediones as inhibitors of protein tyrosine phosphatases // *Bioorg. Med. Chem.* – 2007. – **15.** – P. 5137–5149.

*Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії  
НАН України, Київ*

*Надійшло до редакції 13.03.2011*

**M. V. Shevchuk, V. Yu. Tanchuk, L. A. Kononets, I. B. Kulik, A. V. Rybakova,  
V. D. Romanenko, A. E. Sorochinsky,**  
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **A. I. Vovk,**  
Academician of the NAS of Ukraine **V. P. Kukhar**

### **Benzo[d][1,3]dioxole-containing derivatives of $\alpha$ -aminophosphonic acids: synthesis and inhibition of protein tyrosine phosphatases**

*Benzo[d][1,3]dioxole substituted  $\alpha$ -aminophosphonic acids of the general formula  $\text{HCO}_2\text{CH}(\text{R}^2)\text{N}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CH}(\text{R}^1)\text{PO}_3\text{H}_2$ , where  $\text{R}^1 = \text{Ph}, 4\text{-CF}_3\text{C}_6\text{H}_4, \text{CF}_3, \text{CHF}_2(\text{CF}_2)_5$ ;  $\text{R}^2 = \text{benzo[d][1,3]dioxol-5-yl, thiophen-2-yl}$ , are synthesized and their activities toward Yersinia protein tyrosine phosphatase,  $\beta$ -protein tyrosine phosphatase, and protein tyrosine phosphatase 1B, the potential targets for drugs, are evaluated. The results of studies show a promise for benzo[d][1,3]dioxole substituted N-phosphonomethylglycine derivatives as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B and provide a basis for their further structural optimization.*