



УДК 541.

© 2008

Академик НАН України С. А. Андронати, О. Л. Маловичко,
А. В. Туров, А. А. Крысько, Т. А. Кабанова, П. Г. Полищук

Синтез и свойства 4-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил)амино-4-оксобутаноил-D-β-фенил-β-аланина — нового RGDF миметика

The novel RGDF mimetic, 4-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-7-yl)amino-4-oxobutyryl-D-β-phenyl-β-alanine, has been synthesized. Resulting from the conformational search, three groups of conformers have been revealed. It might be assumed on the base of NOESY spectroscopy data that the “extended” conformers are most likely realized in a DMSO solution. It is established that the synthesized peptidomimetic demonstrates a high in vitro antiaggregative activity ($IC_{50} = 7.9$ nM) and a high affinity to fibrinogen receptors ($IC_{50} = 0.3$ nM).

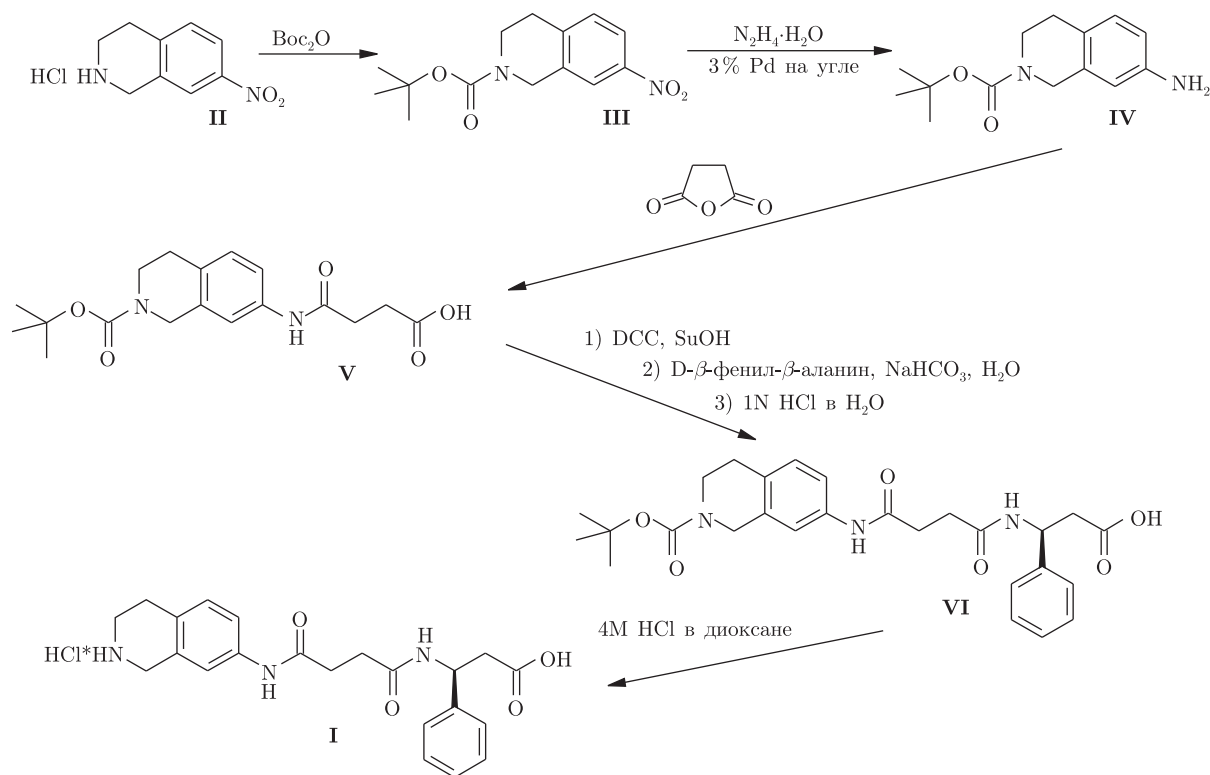
Процесс тромбообразования является одной из основных причин инфаркта миокарда, инсульта, периферической ишемии и паралича [1]. Для лечения тромбозов применяют антикоагулянты, фибринолитики и антиагреганты [2]. Наибольший интерес среди антиагрегантов представляют антагонисты фибриногеновых рецепторов. Образование супрамолекулярных комплексов фибриноген-фибриногеновый рецептор (интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$) приводит к агрегации тромбоцитов, независимо от того, какой из агонистов спровоцировал процесс агрегации в его начале (АДФ, адреналин, коллаген, ФАТ и др.) [3]. Ответственным за процесс связывания фибриногена с рецептором является трипептидный фрагмент — RGD (Arg-Gly-Asp), который входит в состав фибриногена [4]. Связывание фибриногена с $\alpha_{IIb}\beta_3$ может блокироваться различными RGD-содержащими пептидами. RGD последовательность является основной для дизайна новых антагонистов $\alpha_{IIb}\beta_3$, ингибиторов агрегации тромбоцитов [3]. Перспективным подходом к созданию эффективных антагонистов $\alpha_{IIb}\beta_3$ является синтез пептидомиметиков, фрагменты которых имитируют важные для связывания с интегрином аминокислотные остатки [3]. К антагонистам $\alpha_{IIb}\beta_3$ относятся некоторые моноклональные антитела, RGDF- или RGDS-содержащие пептиды, RGD миметики. Последние вызывают большой интерес исследователей как перспективные и синтетически доступные антагонисты $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Нами были предложены новые Arg-Gly биоизостеры, фрагменты 4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутановой или 4-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил)амино-4-оксобутано-

вой кислоты. На их основе синтезированы новые RGDF миметики — высокоактивные антагонисты $\alpha_{IIb}\beta_3$, ингибиторы агрегации тромбоцитов [5–7].

Цель настоящего исследования — получение RGDF миметика — 4-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил)амино-4-оксобутаноил-D- β -фенил- β -аланина (**I**), изучение его конформационных особенностей, антиагрегационных свойств и аффинитета к $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Синтез целевого RGDF миметика **1** представлен такой схемой:



7-Нитро-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (**II**) использовали в качестве исходного соединения для построения RGDF миметика на основе 4-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил)амино-4-оксобутановой кислоты. Аминогруппу соединения **II** блокировали Вос-защитой. Восстановление нитрогруппы соединения **III** и ацилирование янтарным ангидридом аминопроизводного **IV** приводило к получению 4-(2-Вос-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил)амино-4-оксобутановой кислоты (**V**). Активировали карбоксильную группу соединения **V** при помощи DCC и SuOH, последующее взаимодействие с D- β -фенил- β -аланином в присутствии NaHCO_3 давало Вос-производное **VI**. Удаление Вос-защиты приводило к целевому соединению **I**.

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.

Для отнесения сигналов и выяснения конформационных особенностей RGDF миметика **1** нами были изучены двумерные спектры ^1H ЯМР. Отнесение сигналов в спектрах ^1H ЯМР миметика **1** проводили на основании литературных данных о спектрах ^1H ЯМР производных 1,2,3,4-тетрагидроизохинолина [8] и RGDF миметиков, содержащих фрагмен-

ты янтарной кислоты [9] и β -фенил- β -аланина [9]. Для проверки правильности отнесения сигналов протонов соединения **I** использовали метод двумерной гомоядерной протон-протонной корреляционной спектроскопии (COSY) (рис. 1, а) и методику наблюдения полных корреляций (TOCSY) (см. рис. 1, б). Используемый нами двумерный эксперимент по наблюдению ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY) дает качественную информацию о наличии диполь-дипольных контактов между пространственно сближенными протонами (рис. 2).

На рис. 3 представлена структура RGDF миметика **1** с указанием взаимодействующих пространственно сближенных протонов данной молекулы на основании наличия кросс-пииков в спектре NOESY. Известно, что наличие кросс-пииков в этом спектре (т. е. ЯЭО) свидетельствует о том, что расстояние между взаимодействующими ядрами меньше или равно 0,5 нм. Отсутствие NOE между “дальними” протонами дает возможность предполагать, что данный RGDF миметик в растворе ДМСО пребывает в “вытянутой” конформации. Для подтверждения этого предположения для исследуемого соединения был проведен конформационный поиск средствами NuserChem 7,5 [10] методом молекулярной механики MM⁺. Для сокращения числа конформеров в полученном конформационном наборе в рамках конформационного поиска программы NuserChem проводилась попарная оценка их подобия. Два конформера считались одинаковыми, если разница между энергиями двух конформеров была меньше 0,05 ккал/моль, все соответствующие торсионные углы отличались не более чем на 15° друг от друга, среднеквадратичное расстояние между соответствующими атомами было меньше 0,025 нм (при расчете среднеквадратичного расстояния атомы водорода не учитывались). В процессе проведения поиска отбирались только конформеры, энергия которых отличалась от энергии наиболее энергетически выгодного конформера не более чем на 10 ккал/моль. Всего было найдено 97 конформеров. Все найденные конформеры можно разделить на три группы в соответствии со взаимной ориентацией в них молекулярных фрагментов.

Первая группа конформеров (рис. 4, а) характеризуется сближенным и почти планарным расположением двух ароматических циклов, что, вероятно, обусловлено их стекинг взаимодействием. Согласно расчетам, энергетически это одни из наиболее выгодных конформеров. Однако данная группа конформеров возможна только в условиях вакуума, в растворе ДМСО это будут самые высокие по энергии конформеры, и их доля в смеси будет ничтожна.

Для второй группы конформеров (см. рис. 4, б) характерно наличие изгиба по фрагменту 1,4-бутандикарбоновой кислоты. Конформеры данной группы отличает близкое расположение атома водорода аминогруппы, находящейся в 7 положении 1,2,3,4-тетрагидроизохинолинового цикла, и атома кислорода карбонильной группы, участвующей в образовании амидной связи с остатком β -фенил- β -аланина. Расстояние между указанными атомами варьирует в пределах 0,19–0,21 нм. Энергия этих конформеров находится в диапазоне 1,6–3,5 ккал/моль относительно наиболее энергетически выгодного конформера.

К третьей группе (см. рис. 4, в) можно отнести “вытянутые” конформеры, для которых не характерно наличие каких-либо устойчивых расположений молекулярных фрагментов друг относительно друга. От наиболее энергетически выгодного эти конформеры отличаются по энергии на 3–10 ккал/моль. По данным эксперимента NOESY, третья группа конформеров вероятнее всего реализуется в растворе ДМСО.

Миметик **1** проявил высокую антиагрегационную активность в опытах *in vitro* на богатой тромбоцитами плазме крови человека, $IC_{50} = (7,9 \pm 0,9)$ нмоль. Эксперименты про-

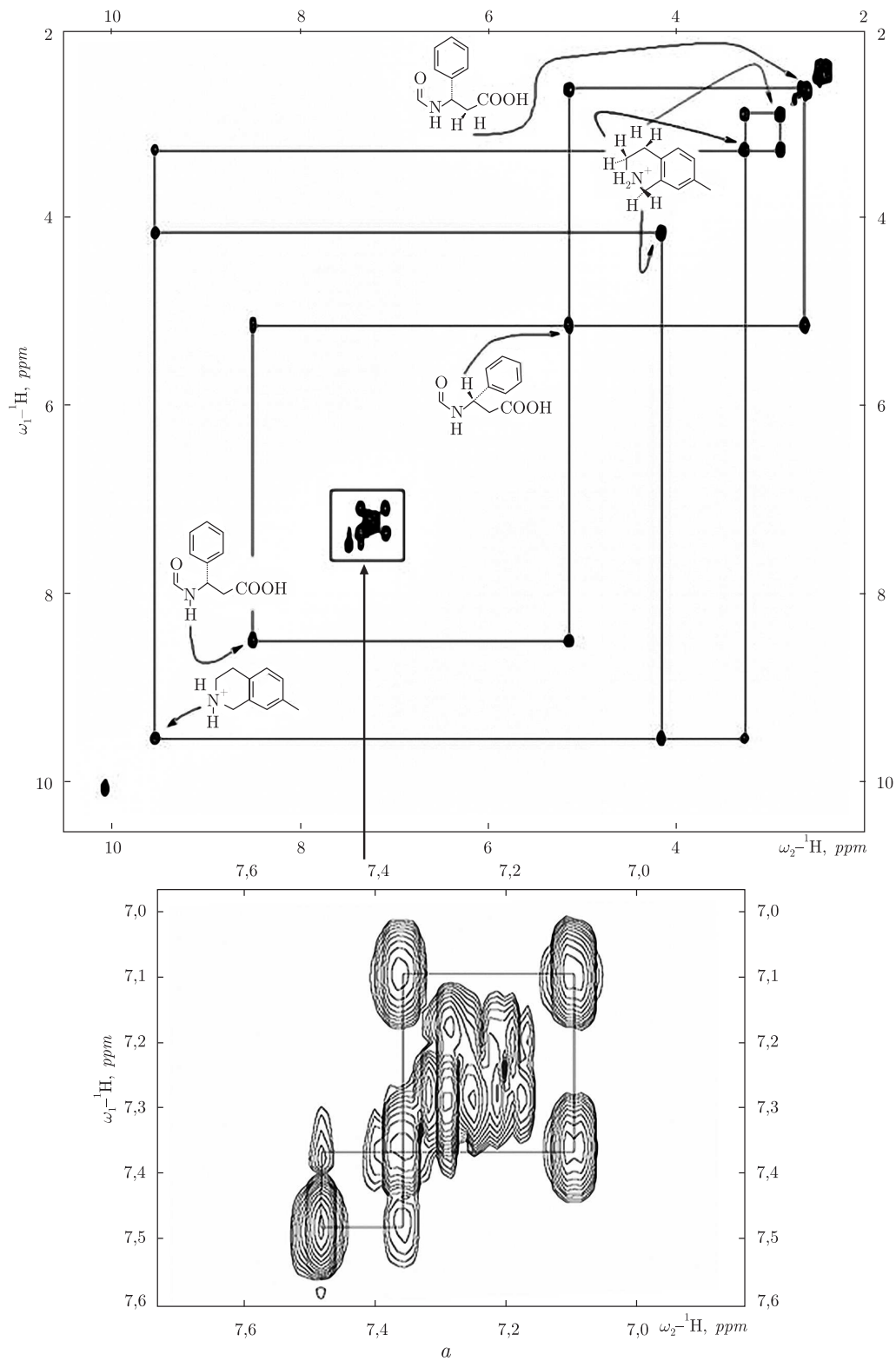


Рис. 1. Полный вид спектра COSY (а) и TOCSY (б) миметика 1, в увеличенном виде представлено отнесение сигналов “области ароматических протонов”

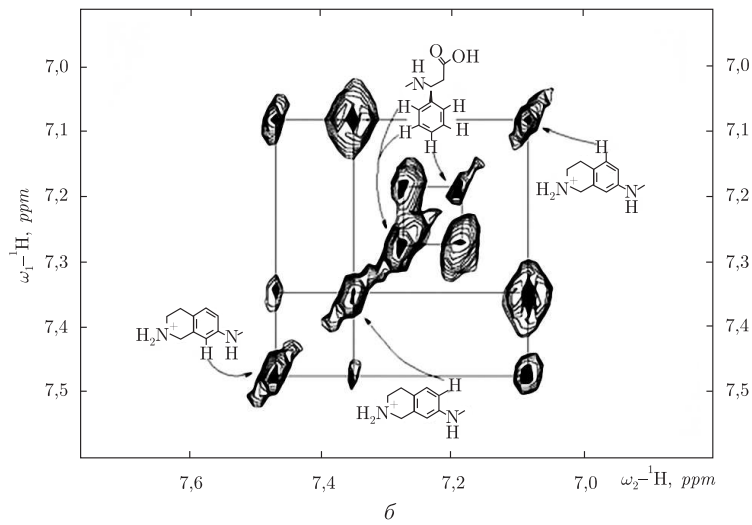
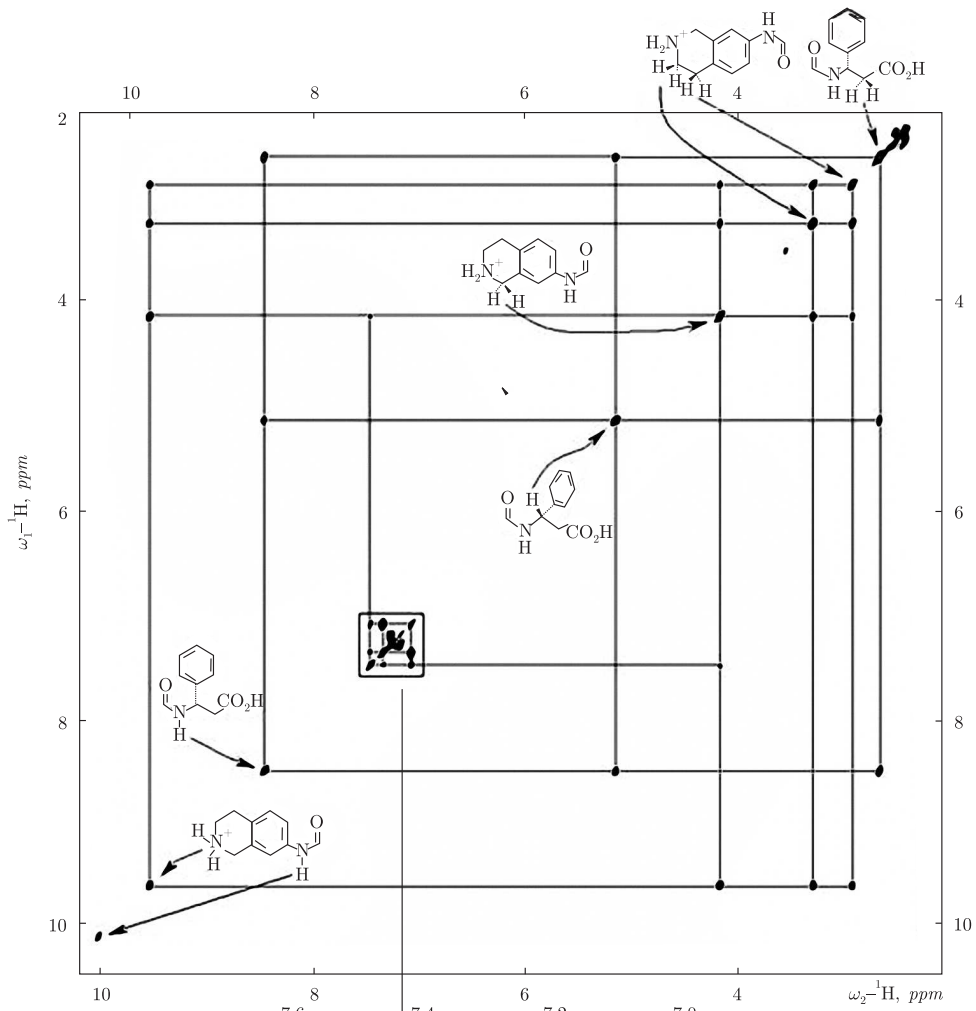


Рис. 1. Продолжение

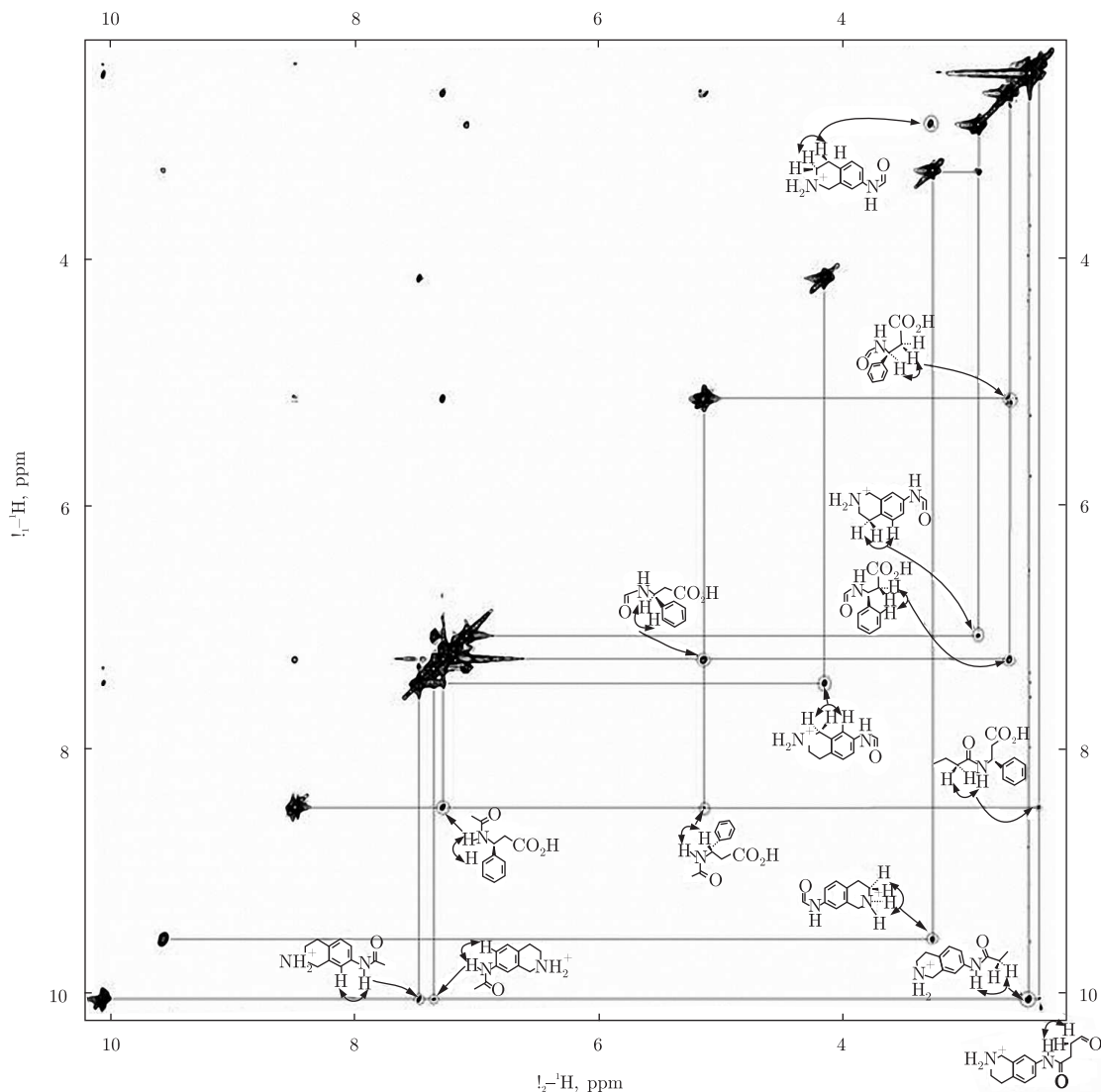


Рис. 2. Двумерный спектр NOESY миметика 1

водились по методу G. V. Vorn [11] на образцах крови, полученных по крайне мере от трех доноров. Богатую тромбоцитами плазму (БТП) получали из крови здоровых доноров, взятой из локтевой вены натощак. АДФ (конечная концентрация 10 мкмоль) была использована как индуктор агрегации тромбоцитов. RGDS пептид, который взяли в качестве вещества сравнения, проявил активность в том же эксперименте с $IC_{50} = (31000,0 \pm \pm 2000,0)$ нмоль. С целью выяснения молекулярного механизма антиагрегационного действия миметика 1 проведено изучение его влияния на специфическое связывание меченого флуоресцеином фибриногена (FITC-Fg) с его рецепторами на суспензии отмытых тромбоцитов человека по методике Z. Xia [12]. FITC-Fg, полученный по методу, описанному R. Nantgan [13], специфически связывается с рецепторами на тромбоцитах с константой диссоциации, равной 1,02 мкмоль. Экспериментальные данные свидетельствуют о высоком аффинитете соединения I к $\alpha_{IIb}\beta_3$, $IC_{50} = (0,30 \pm 0,05)$ нмоль. Значение показателя

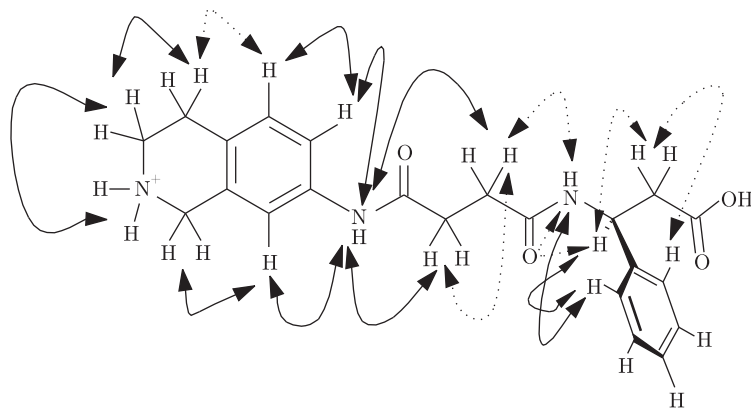


Рис. 3. Диполь-дипольные взаимодействия протонов RGDF миметика 1 (на основании наличия кросс-пиков в спектре NOESY)

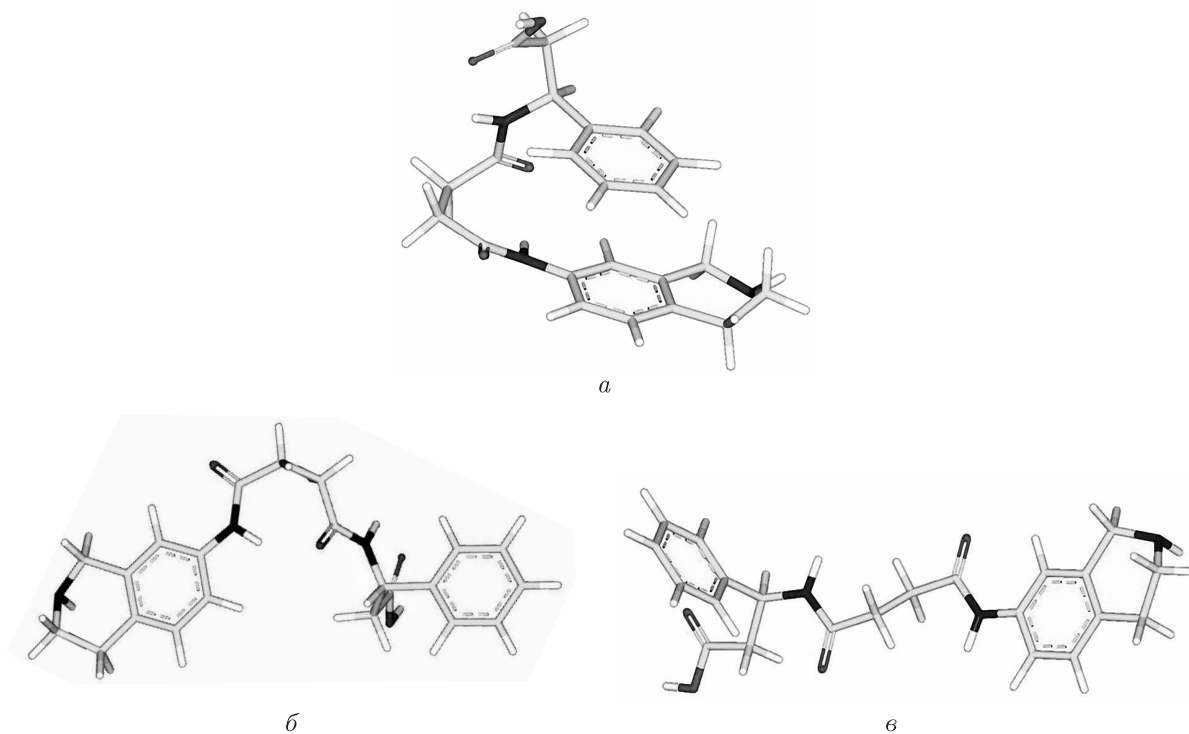


Рис. 4. Структура конформера первой (а), второй (б) и третьей (в) групп

IC_{50} для RGDS пептида (вещество сравнения) в этом же эксперименте равно $(13000,00 \pm 1600,00)$ нмоль.

Таким образом, проведенные исследования позволяют рассматривать соединение **I** как перспективный потенциальный антиагрегант, заслуживающий дальнейшего углубленного изучения.

1. Collier B. S. Blockade of platelet GP IIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy // *Circulation*. – 1995. – **92**, No 9. – P. 2373–2380.
2. Andronati S. A., Krysko A. A., Kabanov V. M. et al. Synthesis and properties of peptidomimetics – platelet aggregation inhibitors // *Acta Polonia Pharmaceut. – Drug Research*. – 2000. – **57 Suppl. Nov.** – P. 15–21.

3. *Andronati S. A., Karaseva T. L., Krysko A. A.* Peptidomimetics – antagonists of the fibrinogen receptors: molecular design, structures, properties and therapeutic applications // *Curr. Med. Chem.* – 2004. – **11**, No 9. – P. 1183–1211.
4. *Mosesson M. W.* Fibrinogen and fibrin structure and functions // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – **3**, No 8. – P. 1894–1904.
5. *Krysko A. A., Chugunov B. M., Malovichko O. L. et al.* Novel fibrinogen receptor antagonists. RGDF mimetics, derivatives of 4-(isoindoline-5-yl)amino-4-oxobutyric acid // *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* – 2004. – **22**, No 14. – P. 5533–5535.
6. *Андронати С. А., Крысько А. А., Чугунов Б. М. и др.* 4-(Изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил- β -алкоксифенил- β -аланины – новые RGDF миметики // Синтез, аффинитет к фибриногеновым рецепторам, антиагрегационные свойства и влияние на них гидрофобности // *Журн. орган. хим.* – 2006. – **42**, No 8. – С. 1195–1202.
7. *Krysko A. A., Malovichko O. L., Andronati S. A. et al.* Novel fibrinogen receptor antagonists – RGDF mimetics, 4-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-7-yl)amino-4-oxo-butyric acid derivatives // *Med. Chemistry.* – 2006. – **2**, No 3. – P. 295–298.
8. *Grunewald G. L., Dahanukar V. H., Caldwell T. M. and Criscione K. R.* Examination of the role of the acidic hydrogen in imparting selectivity of 7-(aminosulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (SK&F 29661) toward inhibition of phenylethanolamine N-methyltransferase and the α_2 -adrenoceptor // *J. Med. Chem.* – 1997. – **40**, No 25. – P. 3997–4005.
9. *Zablocki J. A., Rico J. G., Garland R. B. et al.* Potent in vivo inhibitors of platelet aggregation based upon the Arg-Gly-Asp sequence of fibrinogen. (Aminobenzamidino)succinyl (ABAS) series of orally active fibrinogen receptor antagonists // *Ibid.* – 1995. – **38**, No 13. – P. 2378–2394.
10. *Hyperchem 7.5 software* (2003) Hypercube Inc, 1115 NW 4th Street, Gainesville, FL 32601 USA. Trial version from <http://www.hyper.com>.
11. *Born G. V. R.* Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature.* – 1962. – **194**, No 4832. – P. 927–929.
12. *Xia Z., Wong T., Liu Q. et al.* Optimally functional fluorescein isothiocyanate labelled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation // *British J. Haematology.* – 1996. – **93**, No 13. – P. 204–214.
13. *Hantgan R.* An investigation of fibrin-platelet adhesive interactions by microfluorimetry // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1987. – **927**. – P. 55–64.

Фізико-хімічний інститут ім. А. В. Богатського
НАН України, Одеса
Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Поступило в редакцію 07.02.2008