

УДК 577.32'17.012:543.422.25

А. А. Крысько, О. Л. Маловичко, С. А. Андронати, Т. А. Кабанова

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

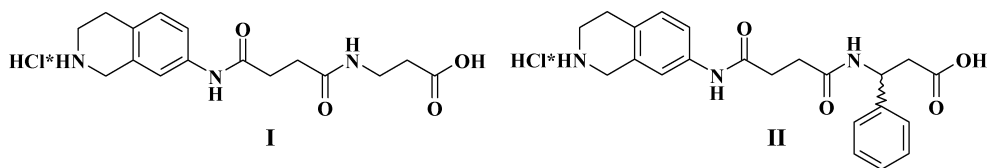
65080, Одесса, Люстдорфская дорога, 86

СИНТЕЗ И АНТИАГРЕГАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО RGDF МИМЕТИКА — 4-(1,2,3,4-ТЕТРАГИДРОИЗОХИНОЛИН-7-ИЛ)АМИНО-4-ОКСОБУТИРИЛ-D-β-ФЕНИЛ-β-АЛАНИНА

Синтезирован новый оптически активный RGDF миметик — 4-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил)амино-4-оксобутирил-D-β-фенил-β-аланин. Установлено, что синтезированный пептидомиметик проявляет высокую антиагрегационную активность *in vitro* ($IC_{50} = 7.9$ нМ) и высокий аффинитет к фибриногеновым рецепторам ($IC_{50} = 0.30$ нМ).

Ключевые слова: RGDF миметик, агрегация тромбоцитов, $\alpha_{IIb}\beta_3$, пептидный синтез.

Ранее были синтезированы линейные RGDF миметики I и II на основе 4-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил)амино-4-оксобутановой кислоты, моделирующей остаток Arg-Gly [1]. Asp-Phe-участок заменён остатками β-аланина или D,L-β-фенил-β-аланина. Синтезированные RGDF миметики, производные 4-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил)амино-4-оксобутановой кислоты, проявили высокую антиагрегационную активность в опытах *in vitro*, на богатой тромбоцитами плазме крови человека. Значения IC_{50} составляли $30,0 \pm 1.6$ нмоль/л (для I) и $13,0 \pm 1,0$ нмоль/л (для II). С целью выяснения молекулярного механизма антиагрегационного действия RGDF миметиков I и II проведено изучение их влияния на специфическое связывание меченого флуоресцеином фибриногена (FITC-Fg) с его рецептором на суспензии отмытых человеческих тромбоцитов. Установлено, что соединения I и II ингибируют связывание FITC-Fg с $\alpha_{IIb}\beta_3$ на суспензии отмытых тромбоцитов человека с IC_{50} , равными $1,20 \pm 0,14$ нмоль/л (для I) и $1,00 \pm 0,12$ нмоль/л (для II) [1].



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

Синтез целевого RGDF миметика III представлен на нижеследующей схеме 1. 7-Нитро-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (IV) использовали в ка-

честве исходного соединения, аминогруппу соединения **IV** блокировали Вос-защитой. Восстановление нитрогруппы соединения **V** и ацилирование янтарным ангидридом аминопроизводного **VI** приводило к получению 4-(2-Вос-1,2,3,4-тетрагидроизохиолин-7-ил)амино-4-оксобутановой кислоты (**VII**). Активировали карбоксильную группу соединения **VII** при помощи DCC и SuOH, последующее взаимодействие с D-β-фенил-β-аланином в присутствии NaHCO₃ давало Вос-производное **VIII**. Удаление Вос-защиты приводило к целевому соединению **III**.

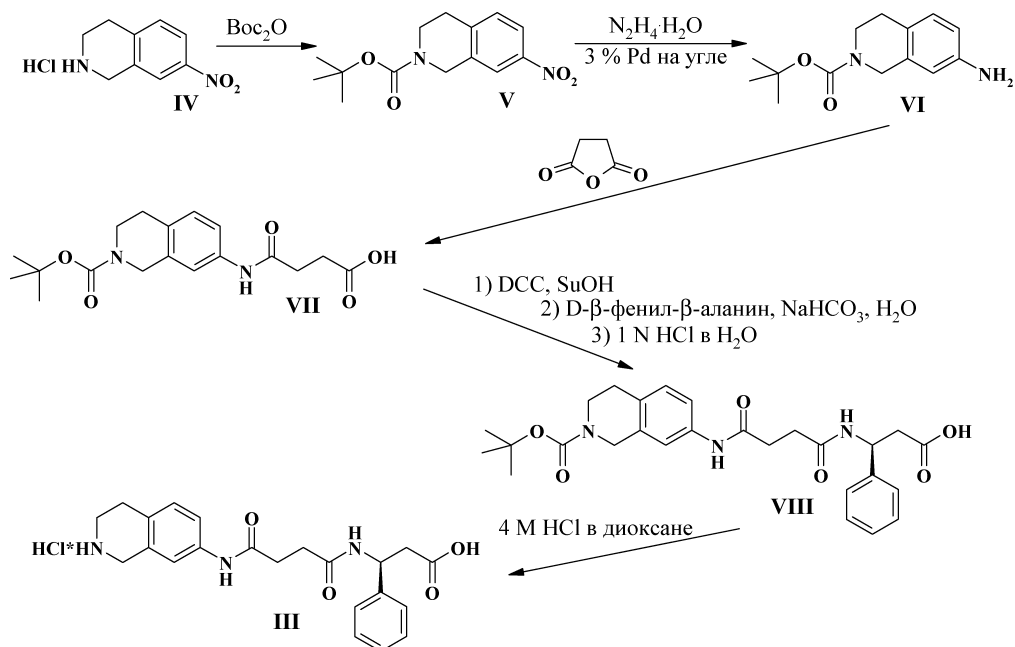


Схема 1. Синтез RGDF миметика **III**

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.

Миметик **III** проявил высокую антиагрегационную активность в опытах *in vitro* на богатой тромбоцитами плазме крови человека, IC₅₀ = 7,9 ± 0,9 нмоль/л. Эксперименты проводились по методу Born G.V. [2] на образцах крови, полученных по крайней мере от трех доноров. Богатую тромбоцитами плазму (БТП) получали из крови здоровых доноров, взятой из локтевой вены натощак. АДФ (конечная концентрация 10 μM) была использована как индуктор агрегации тромбоцитов. RGDS пептид, который взяли в качестве вещества сравнения, проявил активность в том же эксперименте с IC₅₀ = 31000,0 ± 2000,0 нмоль/л. С целью выяснения молекулярного ме-

ханизма антиагрегационного действия миметика III проведено изучение его влияния на специфическое связывание меченого флюоресцеином фибриногена (FITC-Fg) с его рецепторами ($\alpha_{IIb}\beta_3$) на суспензии отмытых тромбоцитов человека по методике Xia Z. [3]. FITC-Fg, полученный по методу, описанному Hantgan R. [4], специфически связывается с рецепторами на тромбоцитах с константой диссоциации (K_d), равной 1,02 μ M. Экспериментальные данные свидетельствуют о высоком аффинитете соединения III к $\alpha_{IIb}\beta_3$, $IC_{50} = 0,30 \pm 0,05$ нмоль/л. Значение показателя IC_{50} для RGDS пептида (вещество сравнения) в этом же эксперименте равно 13000,00 \pm 1600,00 нмоль/л.

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

Экспериментальная часть

Спектры 1H -ЯМР записаны на приборе Varian WXP-300 (Varian, Германия), с рабочей частотой 299,95 МГц, внутренний стандарт — тетраметилсилан, при температуре 25 °С. Масс-спектры FAB записаны на приборе VG 7070 (VG, Великобритания) с использованием глицериновой матрицы, ионизация осуществлялась пучком атомов Хе с энергией 8 keV. ТСХ осуществляли на пластинках Silufol (Kavalier, Чехия) и Kieselgel 60 (Merck, Германия) в следующих системах растворителей: 10 % этилацетат — гексан (А); 40 % этилацетат — гексан (Б); бензол — ацетон — уксусная кислота (100-50-1) (В); хлороформ — этилацетат — метанол (9-3-2) (Г); хлороформ — этилацетат — метанол — уксусная кислота (9-3-2-1) (Д); аммиак — диоксан (1-5) (Е). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидринового и хлор-толуидинового реактивов.

Гидрохлорид 7-нитро-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (IV) [5]. 5,0 г (0,0375 моль) 1,2,3,4-тетрагидроизохинолина растворяли при охлаждении в 18,6 мл концентрированной серной кислоты. Поддерживая температуру ниже -5 °С, прибавляли порциями 4,07 г (0,0402 моль) KNO_3 . После прибавления всего количества KNO_3 реакционную смесь оставляли на ночь при комнатной температуре. Затем ее выливали на 100 г измельченного льда и подщелачивали NH_4OH до pH 9. Продукт экстрагировали хлороформом (3 \times 50 мл), хлороформные вытяжки объединяли и промывали последовательно водой и насыщенным раствором NaCl. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, осушитель отфильтровывали, растворитель упаривали досуха. Остаток растворяли в 30 мл спирта и прибавляли 5 мл концентрированной HCl. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали на фильтре 30 мл спирта. Выход: 3,54 г (53 %). Т.пл. = 217—19 °С. Масс-спектр, m/e (I %): 178 (48), 177 (100), 161 (16), 149 (41), 132 (10), 131 (48), 130 (14), 104 (7), 103 (24), 102 (9), 91 (23), 77 (35), 65 (9), 63 (5), 51 (13), 39 (6), 38 (13), 36 (46).

2-Вос-7-нитро-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (V). 4,0 г (0,0186 моль) IV растворяли в 20 мл воды, прибавляли 1 г (0,0250 моль) NaOH. К раствору прибавляли раствор 4,06 г (0,0186 моль) Вос₂O в 50 мл хлороформа. Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре. Хлороформный слой отделяли, промывали последовательно водой (20 мл), 1 н. раствором HCl (3 × 20 мл), 5 %-ным раствором NaHCO₃ (3 × 30 мл) и водой (20 мл). Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, осушитель отфильтровывали, растворитель упаривали досуха. Выход: 6,11 г (98 %). Масло. R_f = 0,5 (А). Масс-спектр, *m/e* (I %): 222 (9), 221 (10), 205 (8), 57 (100), 41 (11), 32 (49). Масс-спектр FAB, *m/z*: 301 [M+Na]⁺. Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д.: 1,44 с (9H), 2,90 т (J = 5,8 Hz, 2H), 3,58 т (J = 5,8 Hz 2H), 4,63 с (2H), 7,75 д (J = 8,4 Hz, 1H), 8,02 дд (J = 2,5 Hz, 1H), 8,12 д (J = 2,5 Hz, 1H).

2-Вос-7-амино-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (VI). 2,0 г (0,0072 моль) V растворяли в 30 мл спирта, прибавляли 0,1 г 3 %-го Pd/C. При перемешивании смесь доводили до кипения растворителя и постепенно прикапывали 5 мл (0,100 моль) 95 %-ого гидразингидрата. После прибавления всего количества гидразингидрата реакционную смесь кипятили ещё 30 мин. Катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали досуха, а маслообразный остаток сушили 1 ч при температуре 50 °С и давлении 2 мм рт. ст. Выход: 1,75 г (95 %). R_f = 0,62 (Б). Масс-спектр, *m/e* (I %): 248 (12), 192 (22), 191 (40), 119 (32), 72 (5), 60 (48), 57 (60), 56 (41), 55 (15), 45 (64), 44 (45), 43 (73), 42 (6), 41 (100), 39 (25). Масс-спектр FAB, *m/z*: 271 [M+Na]⁺. Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д.: 1,42 с (9H), 2,57 т (J = 5,9 Hz, 2 H), 3,48 т (J = 5,9 Hz, 2H), 4,32 с (2H), 4,88 уш.с (2H), 6,31 с (1H), 6,40 дд (J = 2,2 Hz, J = 8,1 Hz, 1H), 6,78 д (J = 8,1 Hz, 1H).

4-(2-Вос-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил-амино)-4-оксобутановая кислота (VII). 1,0 г (0,004 моль) VI и 0,4 г (0,004 моль) янтарного ангидрида растворяли в 20 мл сухого хлороформа. Смесь доводили до кипения и оставляли при комнатной температуре на 1 ч. Хлороформный раствор промывали 1 н. раствором HCl (2 × 20 мл) и водой (20 мл). Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, осушитель отфильтровывали, а растворитель упаривали досуха. Выход: 1,33 г (95 %). Масло. R_f = 0,37 (Б). Масс-спектр, *m/e* (I %): 292 (6), 291 (8), 274 (15), 273 (23), 249 (10), 229 (11), 201 (13), 192 (20), 191 (38), 175 (7), 147 (8), 132 (9), 120 (7), 119 (45), 57 (100), 56 (5), 41 (19). Масс-спектр FAB, *m/z*: 349 [M+H]⁺, 372 [M+Na]⁺. Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д.: 1,42 с (9H), 2,49 — 2,54 т (4H), 2,70 т (J = 5,8 Hz, 2H), 3,52 т (J = 5,8 Hz, 2H), 4,44 с (2H), 7,06 д (J = 8,1 Hz, 1H), 7,28—7,31 м (1H), 7,45 с (1H), 9,90 с (1H), 12,12 уш.с (1H).

4-(2-Вос-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил)амино-4-оксобутирил-D-β-фенил-β-аланин (VIII). 1,0 г (0,0029 моль) VII, 0,33 г (0,0029 моль) SuOH и 0,59 г (0,0029 моль) DCC растворяли в 20 мл безводного ацетонитрила. Раствор перемешивали 30 мин, выпавший за это время осадок отфильтровывали, а фильтрат упаривали в вакууме при температуре не выше 20 °С. Маслообразный остаток растворяли в 50 мл хлороформа и промывали по-

следовательно водой (20 мл), 1 н. раствором HCl (3 × 20 мл) и 5 %-ным NaHCO₃ (3 × 30 мл). Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, осушитель отфильтровывали, а растворитель упаривали досуха. Маслообразный остаток растворяли в 10 мл изопропанола и к полученному раствору добавляли раствор 0,49 г (0,0058 моль) NaHCO₃ и 0,58 г (0,0029 моль) гидрохлорида D-β-фенил-β-аланина в 10 мл воды. Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре, затем растворитель упаривали в вакууме. Маслообразный остаток растворяли в 50 мл хлороформа и промывали последовательно водой (20 мл), 1 н. раствором HCl (3 × 20 мл) и водой (20 мл). Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, осушитель отфильтровывали, а растворитель упаривали досуха. Сырой продукт очищали методом флеш-хроматографии на Kieselgel 60 (Merck), используя элюенты: хлороформ и 5 %-ный раствор этанола в хлороформе (по объёму). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли и упаривали. Остаток сушили в вакууме над CaCl₂. Выход: 0,41 г (75 %). Масло. R_f = 0,31 (Б). R_f = 0,65 (В). Масс-спектр FАВ, m/z: 496 [M+H]⁺. Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д.: 1,42 с (9H), 2,43—2,54 м (4H), 2,66—2,71 м (4H), 3,52 т (J = 5,4 Hz, 2H), 4,44 с (2H), 5,19 к (J = 7,4 Hz, 1H), 7,05 д (J = 8,4 Hz, 1H), 7,21—7,44 м (7H), 8,43 д (J = 8,4 Hz, 1H), 9,87с (1H), 12,24 уш.с (1H).

Гидрохлорид 4-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-ил)амино-4-оксо-бутирил-D-β-фенил-β-аланина (III). 0,347 г (0,0007 моль) Вос-производного VIII растворяли в 20 мл сухого хлороформа и пропускали в течении 1 ч ток сухого HCl. Растворитель упаривали, а твердый остаток сушили 2 ч при температуре 40 °С и давлении 2 мм рт. ст. Выход: 0,27 г (98 %). Вещество гигроскопично. R_f = 0,64 (Д). Масс-спектр FАВ, m/z: 396 [M+H]⁺. Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д.: 2,41—2,54 м (4H), 2,67 д (J = 6,9 Hz, 2H), 2,93 т (J = 5,8 Hz, 2H), 3,30—3,33 м (2H), 4,20 с (2H), 5,18 к (J = 7,7 Hz, 1H), 7,12 д (J = 8,1 Hz, 1H), 7,20—7,31 м (6H), 7,50 с (1H), 8,49 д (J = 8,4 Hz, 1H), 9,52 уш.с (2H), 10,06 с (1H).

Литература

1. Krysko A. A., Malovichko O. L., Andronati S. A., Kabanova T. A., Karaseva T. L., Petrus A. S. Novel fibrinogen receptor antagonists — RGDF mimetics, 4-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-7-yl)amino-4-oxobutyric acid derivatives / Medicinal Chemistry. — 2006. — Vol. 2, № 3. — P. 295—298.
2. Born G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / Nature. — 1962. — Vol. 194, № 4832. — P. 927—929.
3. Xia Z., Wong T., Liu Q., Kasirer-Friede A., Brown E., Frojmnvic M.M.. Optimally functional fluorescein isothiocyanate labelled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation / British J. Haematology. — 1996. — Vol. 93, № 13. — P. 204—214.
4. Hantgan R. An investigation of fibrin-platelet adhesive interactions by microfluorimetry / Biochim. Biophys. Acta. — 1987. — Vol. 927. — P. 55—64.
5. Ajao J. F. and Bird C. W. The preparation and oxidative dimerisation of 2-acetyl-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. A new approach to tetrahydroisoquinoline synthesis / J. Heterocycl. Chem. — 1985. — Vol. 22, № 2. — P. 329—331.

А. А. Крысько, О. Л. Маловичко, С. А. Андронати, Т. А. Кабанова
Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України
65080, Одеса, Люстдорфська дорога, 86

**СИНТЕЗ ТА АНТИАРЕГАЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВОГО RGDF
МІМЕТИКА — 4-(1,2,3,4-ТЕТРАГІДРОІЗОХІНОЛІН-7-ІЛ)АМІНО-4-
ОКСОБУТИРИЛ-D- β -ФЕНІЛ- β -АЛАНІНУ**

Резюме

Синтезовано новий оптично активний RGDF міметик — 4-(1,2,3,4-тетрагідрізохінолін-7-іл)аміно-4-оксобутирил-D- β -феніл- β -аланін. Встановлено, що синтезований пептидоміметик проявляє високу антиагрегаційну активність *in vitro* ($IC_{50} = 7,9$ нМ) та високий афінитет до фібриногенових рецепторів ($IC_{50} = 0,30$ нМ).
Ключові слова: RGDF міметик, агрегація тромбоцитів, $\alpha_{IIb}\beta_3$, пептидний синтез.

A. A. Krysko, O. L. Malovichko, S. A. Andronati, T. A. Kabanova
A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of the
National Academy of Sciences of Ukraine
65080, Odessa, 86 Lustdorfskaya doroga

**SYNTHESIS AND ANTIAGGREGATIVE PROPERTIES OF NEW RGDF
MIMETIC — 4-(1,2,3,4-TETRAHYDROISOQUINOLINE-7-YL)AMINO-4-
OXOBUTYRYL-D- β -PHENYL- β -ALANINE**

Summary

It have been synthesized the novel optically active RGD mimetic — 4-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-7-yl)amino-4-oxobutyryl-D- β -phenyl- β -alanine. It have been established that synthesized peptidomimetic possesses a potent *in vitro* antiaggregative activity ($IC_{50} = 7.9$ нМ) and a high affinity for fibrinogen receptor ($IC_{50} = 0.30$ нМ).

Key words: RGD mimetic, platelet aggregation, $\alpha_{IIb}\beta_3$, peptide synthesis.